



**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA MÉDICA Y BIOFÍSICA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
INSTITUTO DE BIOMEDICINA DE SEVILLA**

## **Papel de HIF1 y PHD3 en la microglía de la enfermedad de Alzheimer**

**Trabajo presentado para optar al grado de Doctor por la  
Universidad de Sevilla**

**Nieves Lara Ureña**

**Sevilla, 2020**

ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**000008745e2000018471**

CSV

**GEISER-8c71-b684-c79b-42f3-954b-6885-3060-b995**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular**



GEISER-8c71-b684-c79b-42f3-954b-6885-3060-b995

ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**000008745e2000018471**

CSV

**GEISER-8c71-b684-c79b-42f3-954b-6885-3060-b995**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular**



GEISER-8c71-b684-c79b-42f3-954b-6885-3060-b995



D. Alberto Pascual Bravo, científico titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas

**CERTIFICA:**

Que la memoria de trabajo titulada “Papel de HIF1 y PHD3 en la microglía de la enfermedad de Alzheimer” elaborada por Nieves Lara Ureña, graduada en Biotecnología y beneficiaria del programa de Formación de Profesorado Universitario (FPU) por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte del Gobierno de España (FPU14/02115), ha sido realizada bajo su dirección y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctora por la Universidad de Sevilla.

Para que conste firma la presente en Sevilla, a 21 de abril de 2020.

Fdo: Alberto Pascual Bravo



**CSIC**  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**000008745e2000018471**

CSV

**GEISER-8c71-b684-c79b-42f3-954b-6885-3060-b995**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular**



GEISER-8c71-b684-c79b-42f3-954b-6885-3060-b995

ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**000008745e2000018471**

CSV

**GEISER-8c71-b684-c79b-42f3-954b-6885-3060-b995**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular**



GEISER-8c71-b684-c79b-42f3-954b-6885-3060-b995



# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
1.1. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	3
1.1.1. Enfermedad de Alzheimer y principales rasgos patológicos	3
1.1.2. Tipos de Alzheimer	5
1.2. MICROGLÍA	7
1.2.1. Origen de la microglía y funciones	7
1.2.2. Microglía y Alzheimer	12
1.3. HIPOXIA	13
1.3.1. La importancia de la regulación del suministro de O <sub>2</sub>	13
1.3.2. HIF y su regulación	14
1.3.3. Hipoxia e inflamación	16
1.3.4. Hipoxia y sistema inmune innato	18
1.3.5. Hipoxia y Alzheimer	20
1.4. TRABAJO PREVIO DEL LABORATORIO	22
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>31</b>
2.1. HIF1 EN LA MICROGLÍA DE LA EA	31
2.2. PHD3 EN LA MICROGLÍA DE LA EA	31
<b>3. RESULTADOS</b>	<b>35</b>
3.1. OBJETIVO 1: HIF1 EN LA MICROGLÍA DE LA EA	35
3.1.1. Las células que rodean a las placas de A $\beta$ están hipoperfundidas e hipóxicas y tienen una elevada expresión de HIF1	35
3.1.2. La firma hipóxica de la microglía está incrementada en la A $\beta$ AM y su expresión es dependiente de HIF1	38
3.1.3. La coexistencia de la HMS y la OXPHOS define la A $\beta$ AM	44
3.1.4. La función y supervivencia de la A $\beta$ AM requiere el catabolismo oxidativo de la glucosa	56
3.2. OBJETIVO 2: PHD3 EN LA MICROGLÍA DE LA EA	64
3.2.1. <i>Egln3</i> se expresa en la A $\beta$ AM	64
3.2.2. La eliminación de <i>Egln3</i> en el modelo de EA APP-PSEN1 no incrementa la HMS	65
3.2.3. La ausencia de <i>Egln3</i> en el modelo murino APP-PSEN1 produce en la microglía un incremento del fenotipo DAM, un ajuste metabólico y disminución de la respuesta antiviral	67



3.2.4. La respuesta antiviral está disminuida en la microglía de los ratones <i>APP-PSEN1</i> con deficiencia en <i>Egln3</i> .....	74
3.2.5. Algunos genes sirven como marcadores genéticos a nivel de corteza para observar los cambios que se producen en microglía al eliminar <i>Egln3</i> en los ratones <i>APP-PSEN1</i> .....	80
3.2.6. FOXO3 regula la expresión de los genes de la IFN- $\beta$ S en microglía primaria e interacciona con PHD3.....	86
<b>4. DISCUSIÓN.....</b>	<b>95</b>
4.1. OBJETIVO 1: HIF1 EN LA MICROGLÍA DE LA EA .....	95
4.2. OBJETIVO 2: PHD3 EN LA MICROGLÍA DE LA EA.....	101
<b>5. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS .....</b>	<b>111</b>
5.1. CONCLUSIONES .....	111
5.2. CONCLUSIONS.....	112
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>115</b>
6.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN .....	115
6.1.1. Mantenimiento y cuidados generales .....	115
6.1.2. Líneas utilizadas .....	115
6.1.3. Genotipado de animales .....	117
6.2. CULTIVOS CELULARES.....	120
6.2.1. Cultivos primarios de microglía.....	120
6.2.2. Cultivos de células HEK-293T .....	121
6.2.3. Tratamientos <i>in cellulo</i> .....	121
6.3. AISLAMIENTO DE MICROGLÍA DEL TEJIDO CEREBRAL DE RATONES ADULTOS.....	123
6.4. EXTRACCIÓN DE ARN .....	127
6.4.1. Extracción de ARN en microglía de cultivo primario .....	127
6.4.2. Extracción de ARN en microglía aislada por FACS .....	127
6.4.3. Extracción de ARN en muestras de corteza.....	127
6.5. RETROTRANSCRIPCIÓN DEL ARN .....	128
6.6. PCR CUANTITATIVA.....	129
6.6.1. Condiciones de PCR cuantitativa con <i>Syber Green</i> .....	129
6.6.2. Condiciones de PCR cuantitativa con sonda <i>Taqman</i> .....	130
6.7. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS .....	131
6.7.1. Extracción de proteínas en células de microglía .....	131
6.7.2. Extracción de proteínas en células HEK-293T .....	131
6.8. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS .....	131



6.8.1. Cuantificación de proteínas de muestras procedentes de cultivos primarios de microglía .....	131
6.8.2. Cuantificación de proteínas de muestras procedentes de células HEK-293T.....	132
6.9. INMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS .....	132
6.10. WB .....	133
6.10.1. WB de muestras procedentes de cultivos primarios de microglía .....	133
6.10.2. WB de muestras procedentes de células HEK-293T .....	134
6.11. ESTUDIO TRANSCRIPTÓMICO .....	135
6.11.1. Arrays de expresión.....	135
6.11.2. Análisis de expresión global de genes.....	136
6.11.3. TFEA.....	136
6.12. ANÁLISIS BIOENERGÉTICO .....	137
6.13. TINCIÓN INMUNOFLUORESCENTE PARA IBA1, DAPI Y TIO-S.....	138
6.14. INMUNODETECCIÓN PARA <i>EVANS BLUE</i> .....	139
6.15. INMUNODETECCIÓN PARA HIPOXIA .....	139
6.16. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA .....	140
6.17. ISH COMBINADA CON INMUNOFLUORESCENCIA .....	140
6.18. CUANTIFICACIÓN DE VASOS PERFUNDIDOS .....	142
6.19. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	142
<b>7. SUMMARY .....</b>	<b>145</b>
7.1. INTRODUCTION .....	145
7.2. RESULTS AND DISCUSSION.....	147
7.2.1. Objective 1: HIF1 in AD microglia .....	147
7.2.2. Objective 2: PHD3 in AD microglia.....	148
7.3. CONCLUSIONS.....	150
7.4. MATERIALS AND METHODS.....	151
<b>8. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>155</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>181</b>
9.1. TABLAS SUPLEMENTARIAS.....	181
9.2. ÍNDICE DE FIGURAS .....	317
9.3. ÍNDICE DE TABLAS .....	320
9.4. ABREVIATURAS.....	322



ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**000008745e2000018471**

CSV

**GEISER-8c71-b684-c79b-42f3-954b-6885-3060-b995**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular**



GEISER-8c71-b684-c79b-42f3-954b-6885-3060-b995

# INTRODUCCIÓN

ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**000008745e2000018471**

CSV

**GEISER-8c71-b684-c79b-42f3-954b-6885-3060-b995**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular**



GEISER-8c71-b684-c79b-42f3-954b-6885-3060-b995

ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**000008745e2000018471**

CSV

**GEISER-8c71-b684-c79b-42f3-954b-6885-3060-b995**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular**



GEISER-8c71-b684-c79b-42f3-954b-6885-3060-b995

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

### 1.1.1. Enfermedad de Alzheimer y principales rasgos patológicos

La enfermedad de Alzheimer (EA) fue descrita por primera vez en el año 1907 por el psiquiatra y neurólogo Alois Alzheimer, aunque no fue hasta el año 1910 cuando se utilizó por primera vez el término EA para referirse a esta enfermedad (Hunting, 2015). La descripción de Alois Alzheimer se basó en el análisis *post mortem* del cerebro de una paciente que sufría pérdida progresiva de memoria, entre otros síntomas, y que acabó falleciendo tras 4 años y medio de enfermedad en estado de invalidez total. El análisis de su cerebro reveló la presencia de agregados fibrilares intracelulares, así como la deposición de depósitos proteicos extracelulares en la corteza cerebral (Alzheimer, 1907; Stelzmann et al., 1995).

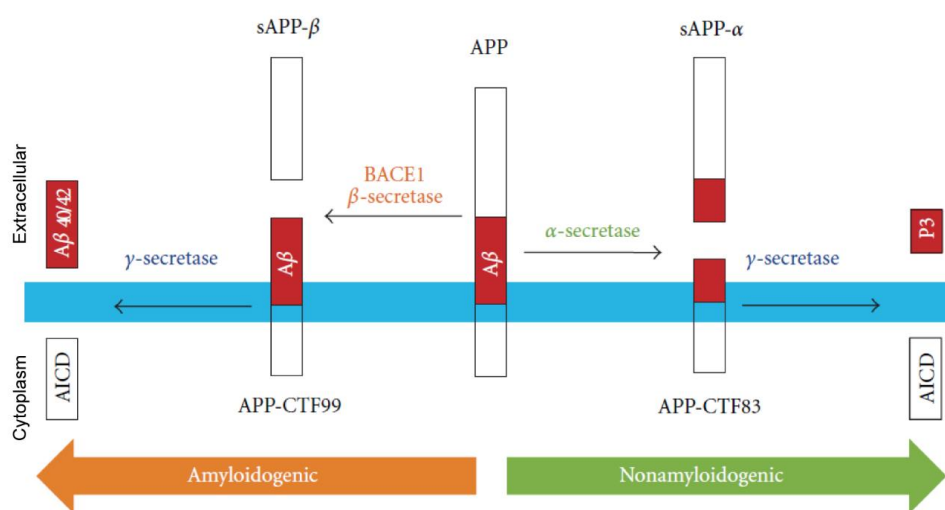
La EA es una enfermedad neurodegenerativa, y es considerada la principal causa de demencia. Se estima que alrededor del 70% de los casos de demencia se deben a la EA (Reitz & Mayeux, 2014). A nivel mundial, alrededor de 47 millones de personas vivían con demencia en el año 2015, y se prevé que el número se triplique para el año 2050 (Livingston et al., 2017). La demencia se caracteriza por una disminución de la memoria, el lenguaje, la resolución de problemas y otras habilidades cognitivas que afectan a la capacidad de una persona para realizar actividades cotidianas (Alzheimer's Association, 2016). Clínicamente la EA se caracteriza por un deterioro cognitivo progresivo, que conduce a una función de memoria dañada (incluida la capacidad de formar recuerdos recientes), y que evoluciona afectando a otras funciones intelectuales. Con la progresión de la enfermedad y debido a la disfunción cortical generalizada, los pacientes se vuelven dementes, afásicos (con incapacidad o dificultad para comunicarse), desorientados, inmóviles y en estadios avanzados pueden volverse completamente dependientes de los demás (Domingues et al., 2017). La EA es finalmente fatal, y es reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una prioridad de salud pública mundial (Lane et al., 2018).

A nivel neuropatológico, la EA se caracteriza principalmente por la acumulación del péptido  $\beta$ -amiloides ( $A\beta$ ; del inglés, *amyloid- $\beta$* ) agregado en forma de placa (placas amiloides o placas de  $A\beta$ ), y por la presencia de ovillos neurofibrilares (NFTs; del inglés, *neurofibrillary tangles*). Adicionalmente, se observan hilos de neuropilo, astrogliosis y activación microglial (Serrano-Pozo et al., 2011). Las consecuencias posteriores de estos procesos incluyen la neurodegeneración, con pérdida sináptica y neuronal, que conduce a atrofia macroscópica (Lane et al., 2018).



## INTRODUCCIÓN

Las placas amiloides son acumulaciones extracelulares del péptido A $\beta$  plegado anormalmente. Este péptido puede estar formado por 40 (A $\beta_{40}$ ) o por 42 (A $\beta_{42}$ ) aminoácidos, que son los dos principales subproductos del procesamiento de la proteína precursora amiloide (APP; del inglés; *amyloid precursor protein*) tras su escisión secuencial por las enzimas  $\beta$  y  $\gamma$  secretasa (procesamiento por la ruta amiloidogénica) (**Figura 1**). A $\beta_{42}$  es más abundante que A $\beta_{40}$  en placas debido a su mayor tasa de fibrilación y su mayor insolubilidad (Serrano-Pozo et al., 2011).



**Figura 1. Procesamiento de la APP: vía amiloidogénica y no amiloidogénica.** La proteína transmembrana APP (membrana indicada en azul) puede ser procesada por dos vías, la no amiloidogénica y la amiloidogénica. En la vía no amiloidogénica la enzima  $\alpha$ -secretasa corta en la región A $\beta$  (roja) y se obtiene el fragmento soluble APP- $\alpha$  (sAPP- $\alpha$ ) y el fragmento APP C-terminal 83 (APP-CTF83). Este último fragmento es cortado por acción de la enzima  $\gamma$ -secretasa, obteniéndose el dominio APP intracelular (AICD) y el fragmento P3. En la vía amiloidogénica la enzima  $\beta$ -secretasa corta la APP para producir el fragmento soluble APP- $\beta$  (sAPP- $\beta$ ) y el fragmento C-terminal 99 (APP-CTF99), el cual es cortado por la enzima  $\gamma$ -secretasa para producir A $\beta_{40}$ , A $\beta_{42}$  y AICD (modificado de Wang et al., 2012).

Las placas de A $\beta$  en función de su morfología y tinción positiva o negativa para tioflavina S (Tio-S) y rojo Congo, se clasifican como placas de núcleo denso o placas difusas. Las placas de núcleo denso, positivas para el marcaje con Tio-S y rojo Congo, están asociadas con la pérdida sináptica y suelen estar rodeadas por astrocitos reactivos, células microgliales activadas, así como por neuritas distróficas, que son dendritas o axones inflamados que se caracterizan por la acumulación de varios orgánulos celulares y proteínas del citoesqueleto (Serrano-Pozo et al., 2011). Estas placas a su vez se pueden subdividir en placas filamentosas o placas compactas, ejerciendo las placas filamentosas mayores efectos tóxicos sobre las neuronas circundantes que las placas compactas, debido a su conformación más fibrilar (Yuan et al., 2016). Las placas difusas, por el contrario, son depósitos amiloides amorfos con contornos mal definidos y que son negativos para el marcaje con Tio-S o rojo Congo. Estas placas generalmente no están rodeadas





de neuritas distróficas y no se asocian con respuestas gliales o pérdida sináptica. Por lo tanto, no se consideran para el diagnóstico patológico de EA, puesto que son un hallazgo común en el cerebro de personas ancianas con la capacidad cognitiva intacta (Serrano-Pozo et al., 2011).

Los NFTs son agregados de la proteína TAU hiperfosforilada y mal plegada. La hiperfosforilación tiene lugar en regiones específicas de la proteína y se ha sugerido que ocurre de manera anterior a la agregación proteica (Augustinack et al., 2002). Estos agregados pueden encontrarse tanto de forma intracelular en el interior de las neuronas, como de forma extracelular cuando las neuronas mueren (Serrano-Pozo et al., 2011). A diferencia de las placas amiloides, los NFTs tienen una progresión espaciotemporal estereotípica (Arnold et al., 1991; Braak & Braak, 1991; Braak et al., 2006) y tanto su número como su distribución correlacionan con la gravedad del deterioro cognitivo y por tanto con la progresión de la EA (Arriagada et al., 1992; Ingelsson et al., 2004).

### 1.1.2. Tipos de Alzheimer

Existen dos tipos de EA, que se diferencian en la edad de inicio, causa principal que provoca su aparición e incidencia. Sin embargo, comparten los mismos síntomas y lesiones histopatológicas. Así encontramos la EA familiar o de inicio temprano, que afecta a individuos menores de 65 años, se asocia con la herencia mendeliana y representa alrededor del 5% de los casos de EA; y la EA esporádica o de inicio tardío, sin un modo de transmisión consistente que afecta a las personas mayores de 65 años y representa el mayor número de casos entre las personas mayores (90-95% de los casos de la EA) (Domingues et al., 2017).

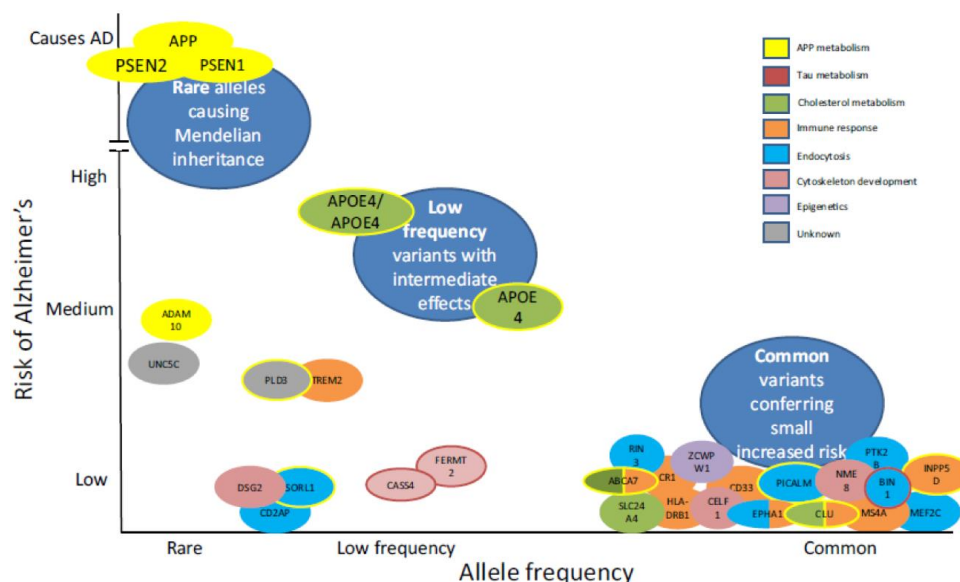
La EA familiar está causada por mutaciones dominantes autosómicas que tienen lugar en los genes *APP*, que codifica para la APP, *PSEN1* y *PSEN2*, que codifican respectivamente para las enzimas presenilina (PSEN) 1 y 2 (**Figura 2**), que forman parte del complejo  $\gamma$  secretasa, involucrado en la generación del péptido A $\beta$  (**Figura 1**). Estas mutaciones afectan al procesamiento de la APP, produciéndose una mayor acumulación total del péptido A $\beta$  en aquellas personas que presentan mutaciones en el gen *APP*, y un incremento del ratio A $\beta_{42}$ /A $\beta_{40}$  en las que tienen mutaciones en el gen *PSEN1* o *PSEN2* (Alzheimer's Association, 2016; Chévez-Gutiérrez et al., 2012; Kumar-Shing et al., 2006; Wu et al., 2012).

Las mutaciones de estos genes soportan las bases de la hipótesis amiloide, la teoría prevalente de la patogénesis de la EA. Esta teoría sugiere que la acumulación de formas patológicas de A $\beta$  producidas por la escisión secuencial de la APP por las enzimas  $\beta$ -secretasa y  $\gamma$ -secretasa en el cerebro, es el proceso patológico primario, produciendo un desequilibrio entre la producción de A $\beta$  y su aclaramiento. La formación de NFTs y la subsecuente disfunción neuronal y



## INTRODUCCIÓN

neurodegeneración, quizás mediada por la inflamación, se cree que son procesos posteriores (Hardy & Higgins, 1992; Hardy & Selkoe, 2002).



**Figura 2. Factores de riesgo genéticos de la EA y sus funciones fisiológicas generales.** El color interno corresponde a sus función. En aquellos que aparecen dos colores internos es porque el gen está implicado en más de una función. Los genes rodeados en amarillo están implicados en el procesamiento de la APP y los genes rodeados en rojo en el metabolismo de TAU (tomado de Lane et al., 2018).

Pero como se ha mencionado anteriormente, en la mayoría de los casos la EA aparece de forma esporádica, y como otras muchas enfermedades crónicas se cree que se desarrolla como resultado de múltiples factores de riesgo.

El primer factor de riesgo y más importante es la edad. La mayoría de las personas que sufren esta enfermedad tienen 65 años o más, y conforme la edad aumenta el riesgo de padecer EA incrementa. Aunque la edad avanzada es un factor de riesgo, la EA no es una parte normal del envejecimiento, y la edad por sí sola no es suficiente para causar la enfermedad (Alzheimer's Association, 2016).

Otro factor de riesgo importante es la presencia del alelo  $\epsilon 4$  del gen que codifica para la apolipoproteína E (*APOE*), la más abundante de su clase en el cerebro humano y que está implicada en el transporte y metabolismo de lípidos, la agregación y aclaramiento de  $A\beta$ , la plasticidad sináptica y la neuroinflamación (Pimenova et al., 2018). La presencia de una copia de este alelo incrementa 3 veces el riesgo de padecer EA, mientras que la presencia de dos copias incrementa de 8 a 12 veces el riesgo (Figura 2) (Holtzman et al., 2012; Loy et al., 2014). A diferencia de haber heredado una mutación genética que causa la enfermedad, heredar el alelo  $\epsilon 4$



del gen *APOE* no garantiza que una persona desarrolle la EA, ni tampoco es necesario tener este alelo para desarrollarla (Chouraki & Seshadri, 2014).

Además de este gen, estudios de asociación del genoma completo (GWAS; del inglés, *genome wide association studies*), han mostrado polimorfismos genéticos en muchos otros genes que también incrementan el riesgo de sufrir EA, entre los que encontramos genes implicados en el metabolismo del colesterol (*CLU*, *ABCA7*, *SORL1*), en la respuesta inmune (*CR1*, *CD33*, *MS4A*, *CLU*, *ABCA7*, *EPHA1*, *TREM2*), o en endocitosis (*BIN1*, *PICALM*, *CD2AP*, *EPHA1*, *SORL1*) entre otros muchos (**Figura 2**) (Bertram et al., 2008; Chouraki & Seshadri, 2014; Harold et al., 2009; Hollingworth et al., 2011; Lambert et al., 2009, 2013; Naj et al., 2011).

Adicionalmente a los factores genéticos, los cuales no podemos modificar, también hay factores de riesgo modificables que contribuyen a la aparición de la demencia (Livingston et al., 2017). Estos factores de riesgo aceleran la progresión de la enfermedad a través de múltiples mecanismos, pero muchos de ellos como por ejemplo la hipertensión, la obesidad, la fibrilación auricular, la diabetes, la inactividad física y el tabaco, convergen en alterar el sistema vascular y/o reducir la disponibilidad de oxígeno (O<sub>2</sub>) y de nutrientes (Livingston et al., 2017; Zlokovic, 2011). Por lo tanto, la hipoperfusión sistémica y la hipoxia podrían contribuir a la EA (Zlokovic, 2011).

## 1.2. MICROGLÍA

### 1.2.1. Origen de la microglía y funciones

La microglía son los macrófagos residentes del sistema nervioso central (SNC) y estas células están íntimamente involucradas en el mantenimiento de la homeostasis cerebral (Ginhoux & Prinz, 2015), participando en la regulación del desarrollo cerebral, el mantenimiento de las redes neuronales y la reparación de lesiones (Colonna & Butovsky, 2017).

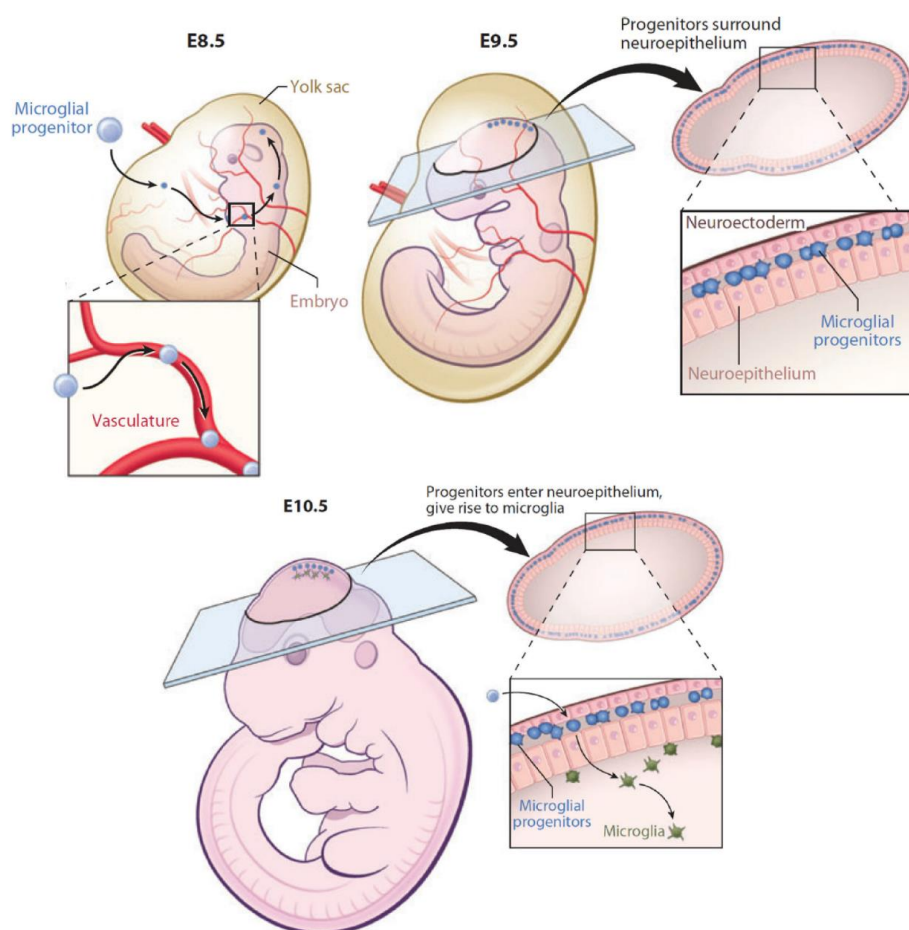
Pío del Río Hortega fue el primero que describió estas células en 1919 (Río-Hortega, 1919) y es considerado el padre de la microglía (Kettenmann et al., 2011). Él describió meticulosamente las características morfológicas básicas de la microglía utilizando una técnica de tinción con plata y un microscopio óptico. Observó las ramificaciones en forma de árbol y predijo su función fagocítica. De hecho, sus análisis histológicos detallados sentaron las bases de nuestra comprensión contemporánea de la biología microglial (Nayak et al., 2014).

Aunque la microglía ha sido estudiada durante mucho tiempo, una larga historia de interpretaciones experimentales erróneas implicó que sus verdaderos orígenes se mantuvieran en debate hasta hace poco. Aunque se conocía que los progenitores microgliales invaden el rudimento cerebral en etapas muy tempranas del desarrollo embrionario (Alliot et al., 1999;



## INTRODUCCIÓN

Ransohoff & Perry, 2009), ahora se ha establecido que la microglía surge de progenitores mieloides del saco vitelino que durante la embriogénesis migran al neuroepitelio y dan lugar al sistema inmune innato en el cerebro adulto (**Figura 3**) (Davalos et al., 2005; Ginhoux et al., 2013; Kierdorf et al., 2013; Kierdorf & Prinz, 2013; Nayak et al., 2014; Nimmerjahn et al., 2005).



**Figura 3. Origen de la microglía.** La microglía tiene un origen distinto de los monocitos/macrófagos derivados de la médula ósea. Las células de microglía derivan de macrófagos primitivos que emanan del saco vitelino embrionario durante el desarrollo (antes del día embrionario 8,5 -E8,5-) y entran en el rudimento cerebral a través del sistema circulatorio. Estos progenitores rodean el neuroepitelio del cerebro en desarrollo alrededor del estadio E9,5 y solo un día después entran en el neuroepitelio y comienzan a colonizar el SNC. La microglía en esta etapa del desarrollo presenta morfología ameboide más que ramificada (modificado de Nayak et al., 2014).

La microglía constituye entre el 5 y el 12% de las células del SNC, dependiendo de la región (Lawson et al., 1990). Son las principales células inmunes residentes en el cerebro y su morfología es heterogénea, clasificándose ampliamente como microglía ramificada y microglía ameboide, basándose en su forma y sus características (Cho & Choi, 2017). Estudios de imagen *in vivo* en



**INTRODUCCIÓN**

cerebros adultos mediante el uso de microscopía confocal de dos fotones, han mostrado que la microglía es bastante dinámica (Davalos et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005; Wake et al., 2009). En estado estacionario las células microgliales son células ramificadas con múltiples prolongaciones que se extienden desde el soma y finalizan en terminaciones bulbosas. Mientras que el cuerpo celular parece mantenerse en una posición relativamente fija, las prolongaciones están en continuo movimiento, sobresaliendo y retrayéndose para cubrir largas distancias e inspeccionar grandes áreas del cerebro. Las prolongaciones contactan neuronas, astrocitos y vasos sanguíneos y constantemente monitorizan el estado funcional de las sinapsis. Microlesiones inducidas por láser estimulan a la microglía situada en las inmediaciones de la lesión, que dirigen sus prolongaciones hacia el sitio de daño para formar estructuras capaces de fagocitar el tejido lesionado. Daños mayores o estímulos inflamatorios inducen cambios morfológicos en la microglía, pasando de tener forma ramificada a tener morfología ameboide. Los cuerpos celulares se agrandan mientras que las ramificaciones se acortan y cubren áreas más limitadas. La morfología ameboide refleja un alto estado de activación que se asocia con fagocitosis y funciones pro-inflamatorias (Colonna & Butovsky, 2017).

La activación de la microglía a menudo se clasifica como clásica (M1) o alternativa (M2) (Appel et al., 2011), siguiendo el paradigma utilizado para macrófagos (Sica & Mantovani, 2012). La activación M1 es un estado pro-inflamatorio y neurotóxico generalmente inducido por el disparo simultáneo de las vías de señalización de receptores tipo toll (TLR; del inglés, *toll like receptor*) e interferón (IFN)  $\gamma$ , mientras que la activación M2 describe las actividades antiinflamatorias y curativas de la microglía (Colonna & Butovsky, 2017). Aunque las categorías M1 y M2 han sido útiles para conceptualizar las actividades de microglía *in vitro*, se acepta cada vez más que el paradigma M1/M2 es inadecuado para describir la activación de macrófagos y microglía *in vivo*, ya que la microglía rara vez muestra un sesgo significativo hacia fenotipo M1 o M2. De hecho, los estudios transcriptómicos muestran que la activación de la microglía es variada, depende del contexto y es mucho más compleja que los estados M1/M2, y así también se ha demostrado en macrófagos (Xue et al., 2014). Durante la función normal del SNC, la microglía tiene un perfil transcriptómico que refleja una actividad de vigilancia (Hickman et al., 2013; Ransohoff, 2016; Wes et al., 2016). En los modelos de neurodegeneración, la microglía expresa factores neurotóxicos y neuroprotectores, genes implicados en la fosforilación oxidativa (OXPHOS; del inglés, *oxidative phosphorylation*), y factores de lisosoma, ribosoma y espliceosoma que intervienen en las respuestas a proteínas mal plegadas, estrés y muerte o lesión neuronal (Chiu et al., 2013; Wes et al., 2016). Es probable que los estudios en curso definan múltiples fenotipos de microglía asociados con el envejecimiento, diferentes afecciones neuropatológicas y etapas de la enfermedad.



## INTRODUCCIÓN

Como se mencionó anteriormente las células microgliales actúan como macrófagos en el SNC, pero son distintas de otros macrófagos tisulares debido a su fenotipo homeostático único y a su estricta regulación por el microambiente del SNC (Colonna & Butovsky, 2017). Diversos estudios han identificado genes que se expresan de forma específica en la microglía, y estos transcriptomas muestran una superposición significativa (Butovsky et al., 2014; Gautier et al., 2012; Hickman et al., 2013; Wolf et al., 2017; Zhang et al., 2014). Un total de 106 transcritos fueron identificados como específicos para la microglía de ratón comparado con otras células mieloides y neurales (Butovsky et al., 2014), y una parte de ellos fueron también encontrados enriquecidos en la microglía humana.

Hasta recientemente, una definición simplista de la microglía la definía como células del sistema inmune innato del SNC de origen mieloides que expresan CX3CR1, CD11B, IBA1 y F4/80 (Ransohoff & El Khoury, 2016). Pero Hickman y colaboradores, basándose en el perfil completo de expresión génica y en estudios funcionales (Hickman et al., 2013; Ransohoff & El Khoury, 2016), proponen una definición funcional y molecular de microglía que correlaciona su expresión génica con sus funciones. El transcriptoma de la microglía revela tres funciones esenciales que son importantes en varias etapas del desarrollo, desde las etapas embrionarias hasta la edad adulta y el envejecimiento, estas funciones son (Hickman et al., 2018):

- Explorar el entorno. La microglía forma una red que abarca el SNC (Lawson et al., 1990). Sus finas prolongaciones son dinámicas y están en constante movimiento, lo que les permite escanear el área que rodea su cuerpo celular y polarizar rápidamente hacia el lugar dañado. Utiliza los productos de casi 100 genes para detectar cambios en su entorno, incluyendo P2YR12, AXL y MER (Fourgeaud et al., 2016; Haynes et al., 2006; Hickman et al., 2013). Los ácidos ribonucleicos mensajeros (ARNm) de estos casi 100 genes se expresan uniformemente en las células de microglía situadas en diferentes zonas del cerebro, lo que sugiere que todas son capaces de realizar su función de explorar el entorno. Esta función es un requisito indispensable para que la microglía realice sus funciones de mantenimiento y defensa del hospedador.
- Llevar a cabo tareas de mantenimiento fisiológico. Las funciones de mantenimiento fisiológico incluyen la remodelación sináptica (una función crítica para el desarrollo del SNC y el mantenimiento de la homeostasis) (Lui et al., 2016; Vasek et al., 2016; Zhang et al., 2014), la migración a sitios de muerte neuronal para fagocitar células muertas, en proceso de muerte o desechos (Fuhrmann et al., 2010; Krasemann et al., 2017), y mantenimiento de la homeostasis de la mielina (Healy et al., 2016). Interactuar con los astrocitos es otra función importante de la microglía involucrada en el mantenimiento de la homeostasis, en inflamación y posiblemente en neurodegeneración (Liddelow et al.,





2017). Entre los genes implicados en estos procesos se encuentran aquellos que codifican los receptores de quimioquinas y quimioatrayentes, genes implicados en fagocitosis (receptores *scavenger* y *Trem2*) y los genes involucrados en la poda y remodelación sináptica (*C1q* y *Cx3cr1*) (Hickman et al., 2013). Un mantenimiento inadecuado puede llevar a neurodegeneración.

- Proteger contra estímulos perjudiciales propios y ajenos. La microglía media la defensa del huésped contra patógenos infecciosos, proteínas perjudiciales como A $\beta$ ,  $\alpha$ -sinucleína agregada, huntingtina mutada, superóxido dismutasa mutante u oxidada, o priones, así como tumores primarios o metastásicos del SNC. Para realizar estas funciones, la microglía expresa los receptores Fc, TLRs, receptores virales y péptidos antimicrobianos (Hickman et al., 2013). En respuesta a estos estímulos, la microglía puede iniciar una respuesta neuroinflamatoria que, como la inflamación periférica, incluye la producción de citoquinas como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ; del inglés, *tumor necrosis factor  $\alpha$* ) e interleuquina (IL) 1 (El Khoury et al., 2003; Hickman et al., 2008), y posiblemente quimioquinas como la quimioquina motivo C-C ligando 2 (CCL2; del inglés, *chemokine C-C motif ligand 2*) (El Khoury et al., 2007), para reclutar células adicionales e inducir las a eliminar agentes dañinos y mantener la homeostasis cerebral. Sin embargo, a diferencia de la inflamación periférica, la neuroinflamación se puede limitar a la microglía, sin reclutar leucocitos circulantes. La neuroinflamación persistente a su vez puede inducir neurotoxicidad, lo que lleva a neurodegeneración.

Esto muestra que no hay microglía en “estado de reposo”. Sus funciones de explorar el entorno, mantenimiento y protección las mantiene constantemente comprometidas, y la mayoría de las células de microglía en cerebros sanos son capaces de realizar estas funciones. La desregulación de cualquiera de estas funciones produce un desequilibrio que inicia o propaga la neurodegeneración (Hickman et al., 2018)

Tanto el envejecimiento como la neurodegeneración inducen un perfil de transcripción de la microglía muy similar. Son diversos los estudios que muestran que se produce una disminución de la expresión de genes homeostáticos como *Cx3cr1*, *P2ry12/P2ry13* y *Tmem119* entre muchos otros, así como un incremento de la expresión de genes que conforman el denominado fenotipo neurodegenerativo microglial (MGnD; del inglés, *microglial neurodegenerative phenotype*) como por ejemplo *Csf1*, *Clec7a*, *Trem2*, *ApoE* y *Tyrob*. A la microglía con este perfil transcripcional se le conoce como microglía asociada a enfermedad (DAM; del inglés, *disease associated microglia*). Cómo se regula el cambio de fenotipo microglial homeostático al MGnD todavía no se conoce con detalle, aunque sí se sabe que es un proceso secuencial mediado por la señalización TREM2-APOE que consta de dos fases, y que el sexo influye también, siendo en las hembras la progresión hacia



## INTRODUCCIÓN

el MGnD más rápida que en los machos (Holtman et al., 2015; Keren-Saul et al., 2017; Krassemann et al., 2017; Sala-Frigerio et al., 2019).

### 1.2.2. Microglía y Alzheimer

Estudios de GWAS evidencian un papel de la microglía en la EA. Mutaciones en *TREM2* se asocian con un incremento del riesgo de padecer EA de 3 a 4,5 veces, un riesgo que en algunas variantes puede llegar a ser tan alto como el asociado con tener una copia del alelo  $\epsilon 4$  del gen *APOE* (Jonsson et al., 2013; Lambert et al., 2013). Mutaciones en otros genes microgliales como *CR1*, *HLA-DRB1*, *CD33*, *MS4A6A* y *BIN1*, se asociaron con un riesgo más modesto de sufrir EA (Lambert et al., 2013) (**Figura 2**). Puesto que estos genes regulan funciones principales en la microglía, entender cómo afectan a la EA tendrá un impacto sobre todos los pacientes con EA, tanto si tienen estas mutaciones como si no (Hickman et al., 2018).

En pacientes de EA y animales modelos de esta enfermedad, la microglía se acumula alrededor de las placas de A $\beta$ , donde su densidad es de 2 a 5 veces mayor que en el parénquima normal (Frautschy et al., 1998). La persistente actividad de las células del sistema inmune innato agrupadas en focos puede inducir hipoxia local (hipoxia inflamatoria) como consecuencia del aumento del metabolismo para cumplir con el costo energético defensivo y biosintético, y de la reducción del suministro de O $_2$  y nutrientes debida a la alteración de la perfusión, morfología y función vascular de los vasos sanguíneos (De Bock et al., 2009; Eltzschig & Carmeliet, 2011). Interesantemente, tanto en el cerebro de pacientes de EA como en modelos murinos de la EA que depositan A $\beta$ , la microvasculatura muestra alteración en la proximidad de las placas de A $\beta$  (Kalaria, 1997; Kawai et al., 1990, 1992; Kouznetsova et al., 2006; Lee et al., 2005; Meyer et al., 2008; Nortley et al., 2019; Sengillo et al., 2013; Sweeney et al., 2018).

La microglía situada en las proximidades de las placas amiloides contiene A $\beta$  intracelular, lo que sugiere que hay fagocitosis (D'Andrea et al., 2004), muestra cambios morfológicos pro-inflamatorios como el incremento del soma y la reducción de las prolongaciones, y tiene incrementados marcadores pro-inflamatorios como el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC; del inglés, *major histocompatibility complex*) tipo II, CD36, IL1, IL6 y TNF $\alpha$  (Martin et al., 2017; Tooyama et al., 1990).

Está descrito que la microglía forma una barrera física para contener la expansión de la placa y proteger a las neuronas (Condello et al., 2015). La deposición de A $\beta$  está regulada por el equilibrio entre la producción de A $\beta$  y su aclaramiento. La microglía de un modelo murino de EA que acumula A $\beta$  muestra reducción de la expresión de receptores de fagocitosis de A $\beta$  y de enzimas de degradación de A $\beta$ , pero su capacidad para producir citoquinas pro-inflamatorias se mantiene, lo que sugiere que la acumulación de A $\beta$  se debe en parte a un fallo en la microglía para





eliminar este péptido tóxico (Hickman et al., 2008). Además, la interacción microglía-A $\beta$  conduce a la pérdida temprana de sinapsis (Hong et al., 2016), la producción de especies reactivas de O<sub>2</sub> (ROS; del inglés, *reactive oxygen species*) y especies reactivas de nitrógeno (RNS; del inglés, *reactive nitrogen species*), la activación del inflamasoma NLRP3 y la producción de citoquinas pro-inflamatorias y TNF $\alpha$  (Coraci et al., 2002; El Khoury et al., 2003; Gold & El Khoury, 2015).

Un estudio reciente propone un papel importante para la microglía en la formación y deposición de la placa de A $\beta$ . Se ha observado que al eliminar gran parte de la microglía del cerebro de un modelo murino de la EA, se produce una disminución en el número de placas de A $\beta$ , y las placas que se observan están principalmente asociadas a las células de microglía que no se consiguen eliminar, lo que sugiere que la microglía es un regulador crítico para la formación de la placa (Spangenberg et al., 2019). También se ha podido observar que el A $\beta$  contenido en el interior de la microglía y que no es eliminado se acumula en el lisosoma y que una acumulación excesiva puede inducir la muerte celular, lo que contribuye a la expansión de las placas de A $\beta$  por la liberación de A $\beta$  en el sitio de muerte (Baik et al., 2016).

Estos datos muestran que la interacción microglía-A $\beta$  es un arma de doble filo. Por un lado, mientras la microglía explora el entrono cerebral, la detección de A $\beta$  hace que éste pueda ser contenido y eliminado. Sin embargo, la producción persistente de estos péptidos y su interacción crónica con la microglía produce un incremento de la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, lo que reduce el aclaramiento de A $\beta$  por parte de la microglía además de promover la hiperfosforilación de TAU y la patología, lo que culmina en un empeoramiento de la enfermedad (Hickman et al., 2018).

## 1.3. HIPOXIA

### 1.3.1. La importancia de la regulación del suministro de O<sub>2</sub>

El O<sub>2</sub> es un elemento fundamental indispensable para la vida. Las células de los organismos aerobios requieren un aporte adecuado de O<sub>2</sub> como aceptor final en la cadena de transporte de electrones para generar trifosfato de adenosina (ATP; del inglés, *adenosine triphosphate*), el cual se usa como energía en la mayoría de las reacciones bioquímicas (Majmudar et al., 2010; Semenza, 2012b, 2012a). La mayor parte del O<sub>2</sub> se usa para este fin, pero también juega un papel importante en procesos de señalización (Hagen et al., 2003).

Cuando la cantidad de O<sub>2</sub> disponible en las células es inferior a la cantidad de O<sub>2</sub> requerida, nos encontramos ante una situación de hipoxia. Esto puede ocurrir tanto en situaciones fisiológicas como en situaciones patológicas. Así, encontramos situaciones de hipoxia en procesos como la



## INTRODUCCIÓN

adaptación a la altitud, durante el desarrollo fetal o incluso en regiones de algunos órganos como por ejemplo en las células del epitelio intestinal (Colgan & Taylor, 2010; Fajersztajn & Veras, 2017; Semenza, 2012b). En situaciones patológicas encontramos hipoxia en infarto de miocardio, ictus o tumores sólidos entre otros (Semenza, 2012a).

La disponibilidad inadecuada de O<sub>2</sub> puede conducir a disfunción e incluso a la muerte celular. Es por ello que los metazoos han desarrollado sistemas para garantizar el suministro adecuado de O<sub>2</sub> a las células y tejidos. Las células detectan cuándo la disponibilidad de O<sub>2</sub> es insuficiente, y son capaces de realizar cambios adaptativos en la expresión génica que mejoran el suministro de O<sub>2</sub> o promueven la supervivencia en un ambiente con bajos niveles de O<sub>2</sub> (Kaelin & Ratcliffe, 2008).

En muchos casos tanto el suministro como el consumo de O<sub>2</sub> están regulados por la hidroxilación postraduccional dependiente de O<sub>2</sub> de los factores inducibles por hipoxia (HIFs; del inglés, *hypoxia inducible factors*), una vía conservada evolutivamente que juega un papel fundamental en este proceso (Kaelin & Ratcliffe, 2008; Semenza, 2011).

### 1.3.2. HIF y su regulación

HIF es una proteína heterodimérica constituida por una subunidad  $\beta$  (HIF1 $\beta$ ), también llamada ARNT1, que se expresa de manera constitutiva, y una subunidad  $\alpha$  inestable (HIF $\alpha$ ). En los metazoos superiores existen 3 subunidades de  $\alpha$ : HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$  y HIF3 $\alpha$ , siendo las dos primeras las más extensamente estudiadas (Kaelin & Ratcliffe, 2008; Majmundar et al., 2010). HIF1 $\alpha$  se expresa de manera ubicua, mientras que la expresión de HIF2 $\alpha$  y HIF3 $\alpha$  solo se da en determinados tejidos (Bertout et al., 2010; Semenza, 2012a).

Bajo condiciones de buena oxigenación, HIF $\alpha$  es hidroxilado en uno o dos residuos de prolina altamente conservados (P402 y P564 en HIF1 $\alpha$  en humanos) por acción de las prolin hidroxilasas (PHDs), lo que provoca la unión de la proteína supresora de tumores *von Hippel Lindau* (VHL), componente de un complejo E3 ubiquitina ligasa. Como resultado HIF $\alpha$  es poliubiquitinado y marcado para su degradación vía proteasoma (**Figura 4**) (Kaelin & Ratcliffe, 2008; Schofield & Ratcliffe, 2004; Semenza, 2012a).

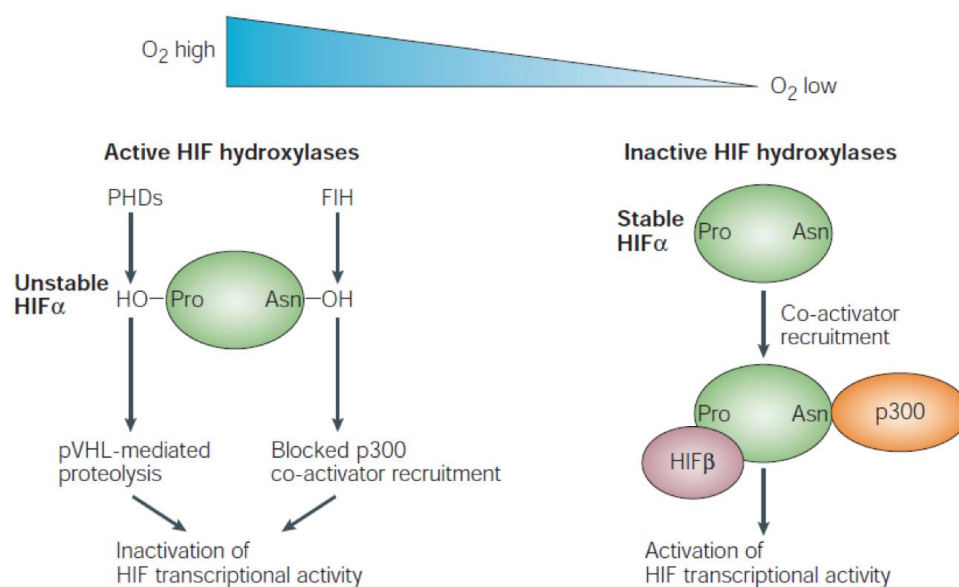
Las PHDs pertenecen a una superfamilia de dioxigenasas dependientes de hierro (II) y 2-oxoglutarato, cuya actividad es absolutamente dependiente de O<sub>2</sub>. Estas proteínas están codificadas por los genes *EGL-9 family hypoxia inducible factor* (EGLN): EGLN1, EGLN2 y EGLN3, que codifican respectivamente para PHD2, PHD1 y PHD3, que son las más ampliamente estudiadas (Kaelin, 2005).



## INTRODUCCIÓN

Estas proteínas se expresan de manera ubicua en todas las células, pero mientras que PHD3 se distribuye homogéneamente, PHD1 se restringe al núcleo y PHD2 al citoplasma (Kaelin, 2005), siendo además PHD2 la principal reguladora de la hidroxilación de HIF1 $\alpha$  (Berra et al., 2003).

HIF $\alpha$  también puede ser hidroxilado por acción del factor inhibidor de HIF (FIH) en un residuo de asparraguina (N803 en HIF1 $\alpha$  en humanos), usando O<sub>2</sub> y 2-oxoglutarato como sustrato. Esta hidroxilación bloquea la asociación de HIF $\alpha$  con el coactivador transcripcional p300/CBP (**Figura 4**) (Lando et al., 2002; Schofield & Ratcliffe, 2004; Semenza, 2012a). FIH permanece activa a concentraciones más bajas de O<sub>2</sub> que las PHDs, por lo que puede suprimir la actividad de las proteínas HIF $\alpha$  que escapan de la destrucción en hipoxia moderada (Dayan et al., 2006; Koivunen et al., 2004).



**Figura 4. Regulación de la estabilidad de la subunidad HIF $\alpha$  por O<sub>2</sub>.** En presencia de O<sub>2</sub> HIF $\alpha$  puede ser hidroxilado por acción de las PHDs o del FIH, disminuyendo e inactivando la subunidad HIF $\alpha$ . Las PHDs hidroxilan a HIF $\alpha$  en residuos de prolina (Pro), marcándolo para su degradación por el proteasoma a través de la ubiquitinación por VHL. El FIH hidroxila a HIF $\alpha$  en un residuo de asparraguina (Asn), provocando el bloqueo del reclutamiento del co-activador p300 e inactivando su actividad transcripcional. En hipoxia, las PHDs y el FIH están inactivos y estos procesos se suprimen, lo que permite la formación de un complejo transcripcionalmente activo (tomado de Schofield & Ratcliffe, 2004).

Bajo condiciones de hipoxia, los bajos niveles de O<sub>2</sub> hacen que la actividad hidroxilasa de las PHDs y del FIH se vea profundamente reducida, dando lugar a la estabilización de HIF $\alpha$ , lo que permite la unión a la subunidad HIF $\beta$ . El complejo resultante se une a los elementos de respuesta a hipoxia (HREs; del inglés, *hypoxia response elements*) y activa la transcripción de sus genes dianas (Kaelin & Ratcliffe, 2008; Schofield & Ratcliffe, 2004; Semenza, 2012b). Entre estos genes dianas se encuentran los que codifican para las propias PHDs, concretamente PHD2 y PHD3, lo



## INTRODUCCIÓN

que establece un bucle de retroalimentación negativa de la actividad de HIF $\alpha$  (Del Peso et al., 2003).

### 1.3.3. Hipoxia e inflamación

La inflamación es una respuesta inmune innata compleja provocada en sitios que experimentan infección, exposición a toxinas y lesiones. Si bien una respuesta inflamatoria adecuada ayuda a destruir los agentes infecciosos y restaura la integridad del tejido, una respuesta inadecuada es dañina, provocando la destrucción del tejido, daño vascular e incluso fallo orgánico en el caso de sepsis (Imtiyaz & Simon, 2010).

El concepto de que la hipoxia puede inducir inflamación ha ganado aceptación general por estudios de la vía de señalización de hipoxia. En personas que pasan un tiempo a elevada altitud, se ha observado un aumento de los niveles de citoquinas pro-inflamatorias circulantes. Además, el desarrollo de inflamación en respuesta a hipoxia es clínicamente relevante, pues se ha demostrado que la isquemia en los trasplantes de órganos incrementa el riesgo de inflamación y de rechazo (Krüger et al., 2009).

Al igual que la hipoxia induce inflamación, las lesiones inflamadas pueden volverse hipóxicas. El incremento en la demanda metabólica de las células y la reducción de los sustratos metabólicos disponibles, así como la multiplicación de patógenos intracelulares, pueden privar a las células de la disponibilidad de O<sub>2</sub> (Giatromanolaki et al., 2003). En tejidos inflamados la hipoxia no es un mero espectador, sino que actúa mediante la regulación de genes dependientes de O<sub>2</sub>.

Además de la vía de activación de HIF dependiente de O<sub>2</sub>, existen otras vías de activación que hacen que HIF se induzca en condiciones de normoxia. Estas vías incluyen citoquinas inflamatorias, factores de crecimiento y productos bacterianos (Imtiyaz & Simon, 2010). Ejemplo de ello es la activación de HIF1 $\alpha$  por acción de lipopolisacáridos (LPS) bacterianos (Blouin et al., 2004) o cuando ROS o la disponibilidad baja de hierro inhiben la acción de las PHDs (Cash et al., 2007; Knowles et al., 2006).

Miembros de la familia del factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B; del inglés, *nuclear factor  $\kappa$ B*) regulan la inflamación, la respuesta inmune y la homeostasis tisular (Naugler & Karin, 2008; Vallabhapurapu & Karin, 2009). Además, interactúan con miembros de la vía HIF-PHD, de manera que vinculan la inflamación con la hipoxia (Taylor, 2008). Citoquinas pro-inflamatorias como TNF $\alpha$  y la IL1 $\beta$ , incrementan la acumulación y la activación transcripcional de HIF1 $\alpha$ . La estimulación de HIF1 $\alpha$  inducida por TNF $\alpha$  requiere de NF- $\kappa$ B para estabilizar HIF1 $\alpha$  a nivel de proteína, sin afectar a su nivel de ARNm (Jung et al., 2003a; Zhou et al., 2003). De manera similar, IL1 $\beta$  actúa sobre la estabilidad de la proteína HIF1 $\alpha$  aumentando la actividad de NF- $\kappa$ B e inhibiendo la degradación



## INTRODUCCIÓN

mediada por VHL (Jung et al., 2003b). El hecho de que HIF pueda activarse en respuesta a citoquinas pro-inflamatorias, indica que juega un papel importante en la inflamación.

La implicación de NF- $\kappa$ B en este proceso es controvertida. Hay estudios que muestran que las bacterias o productos bacterianos como los LPS inducen la expresión del ARNm de *HIF1a* en monocitos humanos a través de la unión de NF- $\kappa$ B al promotor del gen *HIF1a* (Frede et al., 2006), así como en macrófagos que NF- $\kappa$ B es responsable de la transcripción y la estabilidad de la proteína HIF1 $\alpha$ . Por el contrario, otros estudios muestran que la inducción de HIF1 $\alpha$  por LPS no depende de la actividad de NF- $\kappa$ B, sino que depende de la generación de ROS (Nishi et al., 2008). También se ha demostrado en macrófagos que los LPS incrementan la acumulación de la proteína HIF1 $\alpha$  mediante la disminución de los niveles de PHD2 y PHD3 de manera dependiente del TLR4 (Peyssonnaud et al., 2007). Pero al igual que hay estudios que muestran una regulación de HIF por NF- $\kappa$ B, también hay estudios que demuestran que HIF regula a NF- $\kappa$ B (D'Ignazio et al., 2016; Eltzschig & Carmeliet, 2011). Son necesarios más estudios para dilucidar la relación que existe entre HIF y NF- $\kappa$ B, debido a la importancia que tienen estos dos factores de transcripción en la regulación de las respuestas hipóxicas e inflamatorias respectivamente, aunque los estudios más recientes apuntan a que la relación existente entre HIF y NF- $\kappa$ B es dependiente del tipo celular.

Además de por NF- $\kappa$ B, HIF1 $\alpha$  también puede activarse a través de la diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR; del inglés, *mammalian target of rapamycin*). mTOR puede formar dos complejos de señalización diferentes, el complejo 1 (mTORC1) y el complejo 2 (mTORC2) que se activan por varias señales extracelulares que incluyen factores de crecimiento, ligandos de los TLR y citoquinas. La activación de mTORC1 impulsa procesos energéticos como la glucólisis anaerobia –fermentación de glucosa para producir lactato– y la OXPHOS para proporcionar energía celular. A través de HIF1 $\alpha$  y MYC promueve la glucólisis al aumentar la importación de glucosa por un incremento de la expresión del transportador de glucosa (GLUT; del inglés, *glucose transporter*) 1 y por el incremento de la expresión de genes glucolíticos (Weichhart et al., 2015).

La activación de HIF1 $\alpha$  a través de mTORC1 se da por diferentes vías. Una de ellas, a nivel transcripcional, ocurre a través del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3; del inglés, *signal transducer and activator of transcription 3*), un sustrato directo de mTORC1 (Yokogami et al., 2000) que es fosforilado en un residuo de serina y promueve la transcripción de *Hif1a*. Las otras rutas conocidas regulan la actividad de HIF1 $\alpha$  a nivel traduccional, sin afectar a los niveles de expresión del ARNm, estando estas rutas mediadas por la proteína ribosomal S6 quinasa 1 (S6K1; del inglés, *ribosomal protein S6 kinase 1*) que activa la transcripción, o por la proteína 1 de unión a 4E (4E-BP1; del inglés, *4E-binding protein 1*) y el factor de iniciación de la traducción eucariota 4E (eIF4E; del inglés, *eukaryotic translation initiation factor 4E*). En este



## INTRODUCCIÓN

último caso, mTORC1 fosforila a 4E-BP1 impidiendo de esta manera su unión a eIF4E, que permanece activo y permite la traducción de HIF1 $\alpha$  (Dodd et al., 2015).

### 1.3.4. Hipoxia y sistema inmune innato

El sistema inmune innato está compuesto por células *natural killer* (NK), neutrófilos y fagocitos mononucleares, que incluyen macrófagos, monocitos y células derivadas de monocitos así como células dendríticas. El papel que desempeñan estas células en la defensa del hospedador es muy importante, y entre sus funciones encontramos la secreción de citoquinas y quimioquinas con la finalidad de atraer y activar a otras células inmunes, la fagocitosis de patógenos, y la secreción de proteasas antimicrobianas (Harris et al., 2014).

La tensión de O<sub>2</sub> que encuentran estas células es muy variable, siendo mayor en sangre que en los tejidos. Pero esta tensión de O<sub>2</sub> es aún menor en procesos inflamatorios (Harris et al., 2014). Aproximadamente, el 95% de las células mieloides que encontramos en los tejidos inflamados no son células residentes de estos tejidos, sino que son células que han sido reclutadas (Lewis et al., 1999) y han migrado en contra del gradiente de O<sub>2</sub> hasta llegar a las zonas de inflamación (Turner et al., 1999). Las condiciones microambientales en los tejidos lesionados se caracterizan, además de por bajos niveles de O<sub>2</sub>, por niveles bajos de glucosa, así como por una alta concentración de lactato y de metabolitos reductores (Saadi et al., 2002; Schor et al., 2000), por lo que las células sufren un ajuste metabólico que provoca un incremento de las enzimas glucolíticas así como de los transportadores de glucosa para producir ATP de forma anaerobia (Roiniotis et al., 2009). Pero este no es el único efecto que ejerce la hipoxia sobre las células del sistema inmune innato.

En las células del endotelio vascular, los bajos niveles de O<sub>2</sub> provocan un incremento de moléculas de adhesión y quimioquinas, atrayendo así a monocitos circulantes y neutrófilos (Kim et al., 2006; Zünd et al., 1997), que al alcanzar la región hipóxica aumentan a su vez la expresión de moléculas de adhesión, promoviendo de esta forma su arresto y la migración transendotelial o transepitelial hacia el lugar de inflamación. La hipoxia también actúa reteniendo a estas células en el foco de inflamación mediante el incremento de factores que inhiben la migración (Bosco et al., 2006).

Otro efecto de la hipoxia es el aumento de la fagocitosis por parte de neutrófilos y macrófagos, gracias al incremento de receptores de Fc y del complemento. Además, también promueve la liberación de mediadores antimicrobianos, como son  $\beta$ -defensina por macrófagos y elastasa por neutrófilos (McGovern et al., 2011; Nickel et al., 2012), así como la expresión en monocitos y macrófagos de citoquinas pro-inflamatorias, como TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  e IL1 $\beta$  y muchos quimioatrayentes de neutrófilos (Acosta-Iborra et al., 2009; Fang et al., 2009).



## INTRODUCCIÓN

Muchos de estos efectos de la hipoxia están mediados por HIF, mediante la regulación de genes relacionados con la inmunidad innata. Dicha regulación puede darse de forma directa, mediante la unión de HIF a los HREs en la región promotora, o bien de forma indirecta mediante la inducción a través de HIF de otras moléculas y factores de transcripción como por ejemplo NF- $\kappa$ B (Harris et al., 2014).

Para estudiar el papel de HIF en la respuesta inmune innata, Cramer y colaboradores usaron ratones *knock-out* para *Hif1a* y *Vhl* específicamente en la línea mieloide. Esto no disminuyó el número de monocitos ni de neutrófilos circulantes, y los resultados de sus estudios mostraron que HIF1 es esencial para el funcionamiento de las células mieloides *in vitro* y la respuesta inflamatoria *in vivo*. HIF1 $\alpha$  regula la expresión de enzimas glucolíticas, lo que muestra su papel en la producción de energía a través de esta vía para un correcto funcionamiento de las células mieloides. La eliminación de *Hif1a* mostró una reducción de la motilidad, de la capacidad de infiltración y de la capacidad de adhesión de estas células, mientras que la estabilización de HIF1 $\alpha$  mediante la eliminación de *Vhl*, resultó en una respuesta inflamatoria excesiva, así como en una mayor producción de lactato y de edema tisular (Cramer et al., 2003). Pero HIF1 $\alpha$  no es la única diana de VHL, por lo que son necesarios más análisis para determinar qué factores son los que contribuyen a esta desmesurada respuesta inflamatoria en estos ratones (Kondo & Kaelin, 2001).

También se han realizado estudios de pérdida de función de las PHDs, los cuales muestran resultados controvertidos. En pacientes que sufren desórdenes inflamatorios crónicos como la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa, hay una elevada expresión de PHD3 en macrófagos (Escribese et al., 2012). En modelos murinos de colitis ulcerosa y lesión pulmonar aguda, la eliminación genética del gen que codifica para PHD3 se ha asociado a una mejora a través de mecanismos independientes de HIF (Walmsley et al., 2011). Sin embargo, en modelos murinos de sepsis, la deficiencia de PHD3 en macrófagos, pero no la deficiencia de PHD1 o PHD2, hace que adquieran un fenotipo fuertemente inflamatorio y elaboren una enorme respuesta que está mediada por HIF1 $\alpha$  y NF- $\kappa$ B (Kiss et al., 2012). Por lo tanto, son necesarios más estudios para conocer cuál es la contribución de PHD3 en la activación de la respuesta inflamatoria en estas células.

La capacidad de las células del sistema inmune innato para sobrevivir en condiciones limitantes de O<sub>2</sub> es esencial para la defensa del hospedador. Sin embargo, la apoptosis de estas células también es crucial para que se resuelva la inflamación, puesto que una supervivencia y activación prolongada bajo condiciones de bajos niveles de O<sub>2</sub> dan lugar a inflamación crónica (Cross et al., 2006).





## INTRODUCCIÓN

### 1.3.5. Hipoxia y Alzheimer

Estudios epidemiológicos recientes han atribuido específicamente un incremento del riesgo de demencia y EA a enfermedades que cursan con hipoxia, como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y la apnea del sueño (Rusanen et al., 2013; Yaffe et al., 2011). Existen múltiples evidencias de que la EA está asociada con deficiencia sustancial en la función cerebrovascular, como la hipoperfusión de zonas vulnerables del cerebro, la deposición directa del péptido amiloide en la pared de los capilares (angiopatía amiloide) y disfunción de la barrera hematoencefálica (Farkas & Luiten, 2001; Jeynes & Provias, 2006; Montagne et al., 2016; Thal et al., 2008; Zlokovic, 2011). Varios informes han indicado que la disfunción cerebrovascular es un evento temprano en la patogénesis de la EA (Di Marco et al., 2015; Iturria-Medina et al., 2016; Pluta et al., 2013; Wierenga et al., 2014) y, por lo tanto, se podría especular que la hipoxia/isquemia local es un importante potenciador de la patogénesis en lugar de la consecuencia de los cambios patológicos observados en la EA. Además, la isquemia cerebral puede alterar las funciones cognitivas, como por ejemplo el aprendizaje y la memoria espacial y agravar las deficiencias cognitivas inducidas por A $\beta$  (Cohan et al., 2015; Kiryk et al., 2011; Li et al., 2011).

Los efectos de la reducción del flujo sanguíneo cerebral han sido extensamente estudiados a nivel molecular y celular en relación con la EA (Zlokovic, 2011). La reducción o desregulación del flujo sanguíneo cerebral ocurre en personas mayores con alto riesgo de desarrollar EA antes de que se produzca deterioro cognitivo, atrofia cerebral y acumulación de A $\beta$  (Bookheimer et al., 2000; Iadecola, 2004; Knopman & Roberts, 2010; Ruitenberg et al., 2005; Sheline et al., 2010). Recientes estudios de neuroimagen han indicado que el flujo sanguíneo cerebral está reducido en muchas regiones cerebrales y que la hipoperfusión podría ser un marcador preclínico de EA (Hays et al., 2016; Montagne et al., 2016; Wierenga et al., 2014). La hipoperfusión cerebral con creciente angiopatía amiloide cerebral genera hipoxia local, incluso isquemia, lo que provoca alteración del metabolismo energético e induce respuestas adaptativas a través de la expresión de HIF1 (Correia & Moreira, 2010).

Hay abundante literatura que indica que la hipoxia *in vitro* incrementa la generación de péptidos de A $\beta$  en células neuronales (Shiota et al., 2013; Sun et al., 2006; Zhang et al., 2007), astrocitos (Pluta, 2002) así como en endotelio vascular (Bulbarelli et al., 2012; Muche et al., 2015), lo que indica que la hipoxia/isquemia puede estimular el procesamiento por la vía amiloidogénica de la APP en diferentes tipos celulares en el cerebro, y por consiguiente aumentar la patogénesis de la EA (Salminen et al., 2017). La hipoxia incrementa los niveles de deposición de A $\beta$  no solo mediante el aumento del procesamiento de la APP a través de la vía amiloidogénica (por acción de las enzimas  $\beta$  y  $\gamma$  secretasa) con respecto a la vía no amiloidogénica (por acción de la enzima  $\alpha$





secretasa), sino que también lo hace a través de la disminución de enzimas implicadas en la degradación de los péptidos de A $\beta$  (Lall et al., 2019).

La hipoxia crónica produce una disminución de los niveles de las proteínas ADAM10 (Webster et al., 2004) y ADAM17 (Rybnikova et al., 2012), enzimas  $\alpha$ -secretasas que procesan la APP a través de la vía no amiloidogénica, por lo que se produce una disminución de la escisión de dicha proteína a través de esta vía. Además, hay estudios que muestran que la hipoxia crónica incrementa los niveles de expresión de la proteína BACE1, una  $\beta$ -secretasa que promueve la vía amiloidogénica (Li et al., 2009; Peers et al., 2009; Sun et al., 2006; Zhang et al., 2007), así como de las diferentes subunidades del complejo  $\gamma$ -secreta compuesto por PSEN1 o PSEN2, nicastrina (NCT), *anterior pharynx-defective-1* (APH-1) y potenciador de la PSEN2 (PEN2) (Liu et al., 2016; Pluta et al., 2013; Wang et al., 2006). La hipoxia también reduce la expresión de la enzima neprilisina (NEP), una metaloproteasa implicada en la degradación del péptido A $\beta$  (Fisk et al., 2007; Kerridge et al., 2015).

Adicionalmente, la reducción del flujo sanguíneo cerebral y la hipoxia afectan a la síntesis de ATP, disminuyendo la actividad ATPasa y la capacidad de las neuronas para generar potenciales de acción (Kalaria, 2010). La hipoxia también promueve la hiperfosforilación de la proteína TAU a través de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK; del inglés, *mitogen-activated protein kinase*) también conocida como quinasa regulada por señalización extracelular (ERK; del inglés, *extracellular-signal regulated kinase*) (Fang et al., 2010) y produce alteraciones en la expresión de genes vasculares específicos (Wu et al., 2005). En respuesta a hipoxia la mitocondria libera ROS que intervienen en el daño oxidativo en el endotelio vascular y en neuronas con alto nivel de actividad metabólica (Carvalho et al., 2009; Fernández-Checa et al., 2010), así como la hipoxia también altera la función de la barrera hematoencefálica, suprimiendo la eliminación de compuestos tóxicos, como el A $\beta$  del cerebro (Zlokovic, 2011).

Sin embargo, estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio (Serrano-Pozo et al., 2017), mostraron argumentos en contra de que la hipoxia incremente el procesamiento de la APP a través de la vía amiloidogénica *versus* la vía no amiloidogénica. Los experimentos se llevaron a cabo tanto en ratones silvestres (WT; del inglés *wild type*) como en los modelos murinos para la EA, *APP-PSEN1*, que fueron expuestos a condiciones de hipoxia aguda (9% O<sub>2</sub> durante 4 o 72 horas) o hipoxia crónica (9% O<sub>2</sub> durante 21 o 30 días) seguidos o no de un periodo de 24 horas de reoxigenación.

No se observaron cambios en la transcripción de ninguno de los genes relacionados con el procesamiento de la APP por hipoxia, aunque sí que se observó que la reoxigenación provoca un incremento de la expresión de *Psen1* y *App*, pero la magnitud de estos cambios fue tan pequeña



## INTRODUCCIÓN

que su significancia patogénica es incierta. La diferencia de los estudios llevados cabo en nuestro laboratorio con respecto al resto de estudios en los que sí se observan cambios en el procesamiento de la APP, es que no están basados en hipoxia intermitente, por lo que puede atribuirse a los repetidos ciclos de reoxigenación más que a la hipoxia, los cambios observados en los otros estudios (Serrano-Pozo et al., 2017).

A pesar de que la microglía parece jugar un papel importante en la EA, de la relación que existe entre enfermedades que cursan con hipoxia y la EA y de la función que tiene la hipoxia en la regulación de las células mieloides, no hay estudios que muestren cómo los bajos niveles de O<sub>2</sub> afectan a la microglía y el efecto de esto en la EA.

## 1.4. TRABAJO PREVIO DEL LABORATORIO

En el laboratorio se han llevado a cabo estudios previos para investigar la relación que guardan la microglía, la hipoxia y la EA, ya que como se ha comentado anteriormente, varios factores de riesgo modificables de la EA, como hipertensión, obesidad, fibrilación auricular, diabetes, inactividad física y el tabaco, convergen en alterar el sistema vascular y/o reducir la disponibilidad de O<sub>2</sub> y nutrientes (Livingston et al., 2017; Zlokovic, 2011), así como que enfermedades que cursan con hipoxia incrementan el riesgo de padecer la EA (Rusanen et al., 2013; Yaffe et al., 2011), lo que puede contribuir a la disfunción microglial observada en el cerebro de los pacientes con EA.

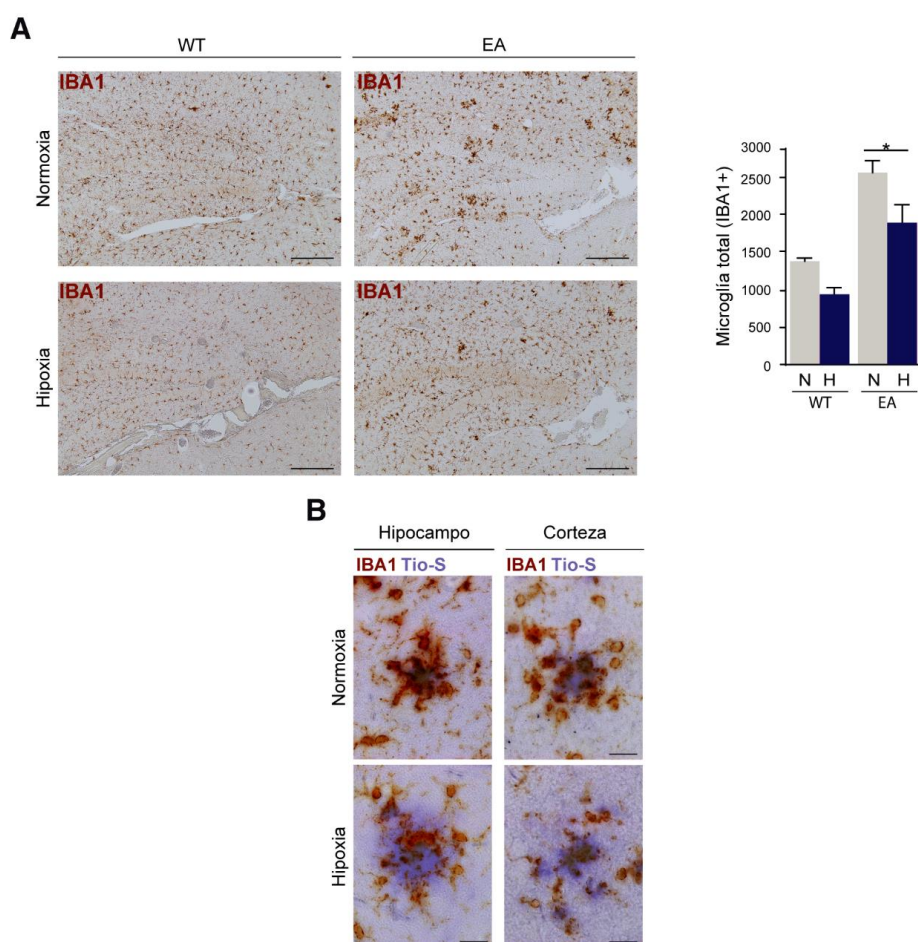
Se expusieron modelos murinos de la EA que acumulan A $\beta$ , en este caso *APP-PSEN1*, así como ratones WT a condiciones de normoxia (21% O<sub>2</sub>) o de hipoxia (9% O<sub>2</sub>) durante 21 días, observándose una disminución en el número de microglía en los animales modelos de la EA expuestos a condiciones de hipoxia (**Figura 5A**). Además no solo disminuyó el número, sino que también se observó una disminución en el agrupamiento de células de microglía (**Figura 5A**), así como una retracción de las prolongaciones de la microglía asociada a A $\beta$  (A $\beta$ AM; del inglés, *A $\beta$  associated microglia*) que en muchos casos estaba incluso ausente (**Figura 5B**) (Heras-Garvín, 2015). Se usó como marcador microglial la molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1 (IBA1; del inglés, *ionized calcium binding adaptor molecule 1*).

La hipoperfusión cerebral ha sido reconocida durante mucho tiempo como una característica temprana de la EA en humanos usando estudios neuropatológicos en el cerebro humano (Love & Miners, 2016a, 2016b; Ruitenberg et al., 2005) y en animales modelos (Iadecola, 2004; Niwa et al., 2002a, 2002b), lo que sugiere que el cerebro de la EA es de hecho hipóxico. Se midieron en muestras de hipocampos de cerebros de pacientes con EA los niveles de expresión de HIF1 $\alpha$ , tanto a nivel de ARNm mediante *quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction* (qRT-PCR)



## INTRODUCCIÓN

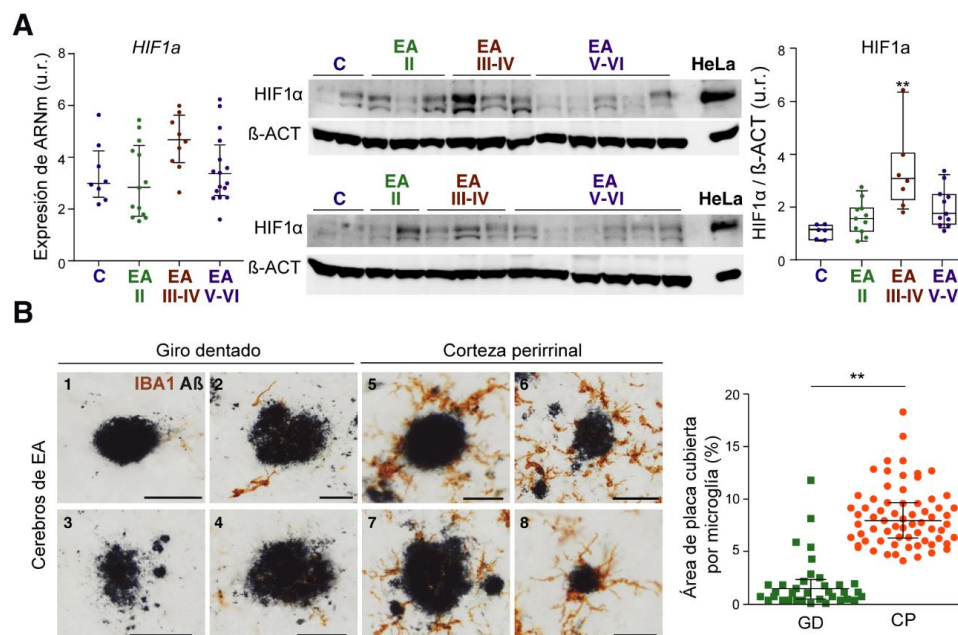
como a nivel de proteína mediante *western blot* (WB), observándose un incremento de expresión conforme avanza la enfermedad (**Figura 6A**) (Heras-Garvín, 2015). Correspondientemente, en regiones del cerebro definidas como áreas propensas a la hipoxia/isquemia por su elevado ratio de células *versus* vasos, como es el giro dentado (Chatzi et al., 2015; Mazumdar et al., 2010), se estudió como estaba la microglía alrededor de las placas de A $\beta$ , observándose una despoblación microglial significativa de las placas seniles en etapas Braak V-VI, en comparación con las placas de la corteza perirrinal, una región control no predispuesta a la hipoxia, de los mismos individuos (**Figura 6B**).



**Figura 5. La hipoxia sistémica crónica disminuye el agrupamiento de la A $\beta$ AM. (A)** Ratones de 14 meses de edad WT y modelos de la EA, *APP-PSEN1* (EA) expuestos a condiciones de normoxia (21% O<sub>2</sub>) o hipoxia (9% O<sub>2</sub>) durante 21 días. El panel izquierdo muestra secciones cerebrales de hipocampo inmunoteñidas para el marcador microglial IBA1. Las barras de escala son de 100  $\mu$ m. La gráfica de la derecha muestra la cuantificación del número total de microglía IBA1+ en normoxia (N; barras grises) e hipoxia (H; barras azules). Se representa la media  $\pm$  error estándar de la media ( $n = 4$ ; \*  $p < 0,05$ ; prueba *t* de Student). **(B)** Secciones de hipocampo (izquierda) y corteza (derecha) teñidas con el marcador microglial IBA1 (marrón) y el marcador de placas de A $\beta$  Tio-S (azul) de ratones *APP-PSEN1* expuestos a condiciones de normoxia (21% O<sub>2</sub>) o hipoxia (9% O<sub>2</sub>) durante 21 días. Las barras de escala son de 20  $\mu$ m.



## INTRODUCCIÓN



**Figura 6. Un área cerebral propensa a la hipoxia muestra disfunción microglial en cerebros de pacientes con EA. (A)** Medida de los niveles de expresión de HIF1α a nivel de ARNm y de proteína en muestras de extractos de hipocampo humano de sujetos controles (C; Braak I; azul), y en estadios de Braak II (EA II; verde); III-IV (EA III-IV; marrón) y V-VI (EA V-VI; morado). El panel izquierdo muestra los niveles de ARNm de *HIF1α* estimados por qRT-PCR. Cada punto representa valores individuales. Se usó *GAPDH* como gen control ( $n = 46$  muestras de EA/control;  $F = 7,124$ ;  $p = 0,0681$ ; test de *Kruskal Wallis*). El panel central muestra los niveles de HIF1α medidos por WB en extractos de proteínas. Se usó β-actina (β-ACT) como control de carga y se utilizó un extracto de células HeLa expuestas a hipoxia (1% O<sub>2</sub>, 4 h) como control positivo para identificar el peso molecular de HIF1α. La gráfica de la derecha de cajas y bigotes muestra la cuantificación del WB usando medidas relativas a β-ACT ( $n = 35$  muestras de EA/control;  $F = 15,78$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; test de *Kruskal Wallis*). **(B)** En el panel izquierdo se representa una doble inmunotinción de microglía (IBA1; marrón) y placas de Aβ (4G8; azul oscuro) en el giro dentado (una región hipóxica; 1-4) y en la corteza perirrinal (una región control; 5-8) de cerebro humano con EA (individuos en estadio Braak V-VI). Las barras de escala son de 50 μm (1-4, 7, 8) y 20 μm (5 y 6). La gráfica de la derecha representa el porcentaje de la periferia de la placa cubierta por microglía IBA1+ (giro dentado; GD;  $n = 36$  placas y corteza perirrinal; CP;  $n = 69$  placas de 3 sujetos con EA diferentes; \*\*  $p < 0,01$ ; test de *Mann-Whitney*).

La despoblación microglial observada alrededor de las placas de Aβ en aquellos animales modelos de la EA que habían sido expuestos a condiciones de hipoxia, mostraron además un incremento de la neurotoxicidad asociada a las placas de Aβ, que se puede observar por la presencia de neuritas distróficas, que muestran un marcaje inmunohistoquímico positivo para ubiquitina (**Figura 7A**) y fosfo-TAU (**Figura 7B**) (Heras-Garvín, 2015).

Para ganar conocimiento acerca de los mecanismos que regulan la agrupación de la microglía alrededor de las placas de Aβ que podría depender de HIF1α, se realizaron estudios centrados en el gen *EglN3*, que codifica para la proteína PHD3, por varios motivos: es un gen diana de HIF bien establecido (Metzen et al., 2003) se expresa altamente en la microglía de la EA (Orre et al., 2014a;

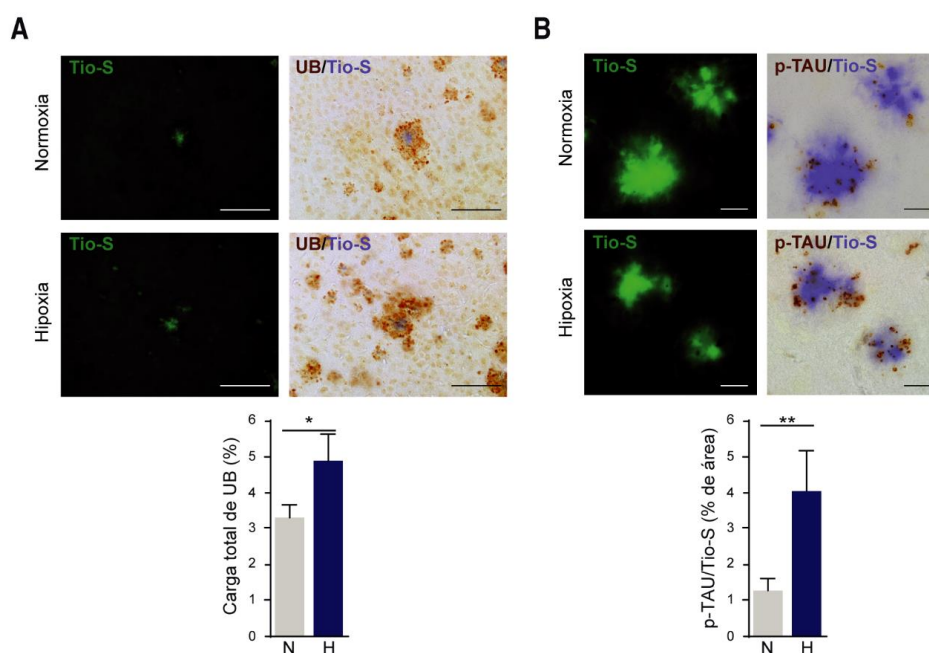


## INTRODUCCIÓN

Wang et al., 2015), y ha sido involucrado en la respuesta inmune innata a la sepsis (Kiss et al., 2012) y en condiciones inflamatorias crónicas (Escribese et al., 2012; Walmsley et al., 2011).

Para estudiar la función de PHD3, se usaron modelos murinos de la EA en los que se eliminó *Egln3*, *Egln3*<sup>-/-</sup>; *APP-PSEN1*. Los estudios realizados mostraron que al eliminar *Egln3* la microglía se situaba más cercana a la placa (**Figura 8A**), lo que además disminuyó la cantidad de neuritas distróficas (**Figura 8B**), indicando una mejor función de barrera de la microglía (Sánchez-García, 2018).

También se estudió si la deficiencia de PHD3 podría mejorar el deterioro cognitivo observado en los modelos murinos de la EA, en los que hay tanto hiperactividad como pérdida de memoria a corto plazo. Lo que se pudo observar es que al eliminar *Egln3* se recuperaba por completo los déficits de comportamiento del modelo de EA, alcanzándose niveles de hiperactividad y memoria a corto plazo de igual nivel que en los animales controles usados (WT y *Egln3*<sup>-/-</sup>) (**Figura 9**) (Sánchez-García, 2018).

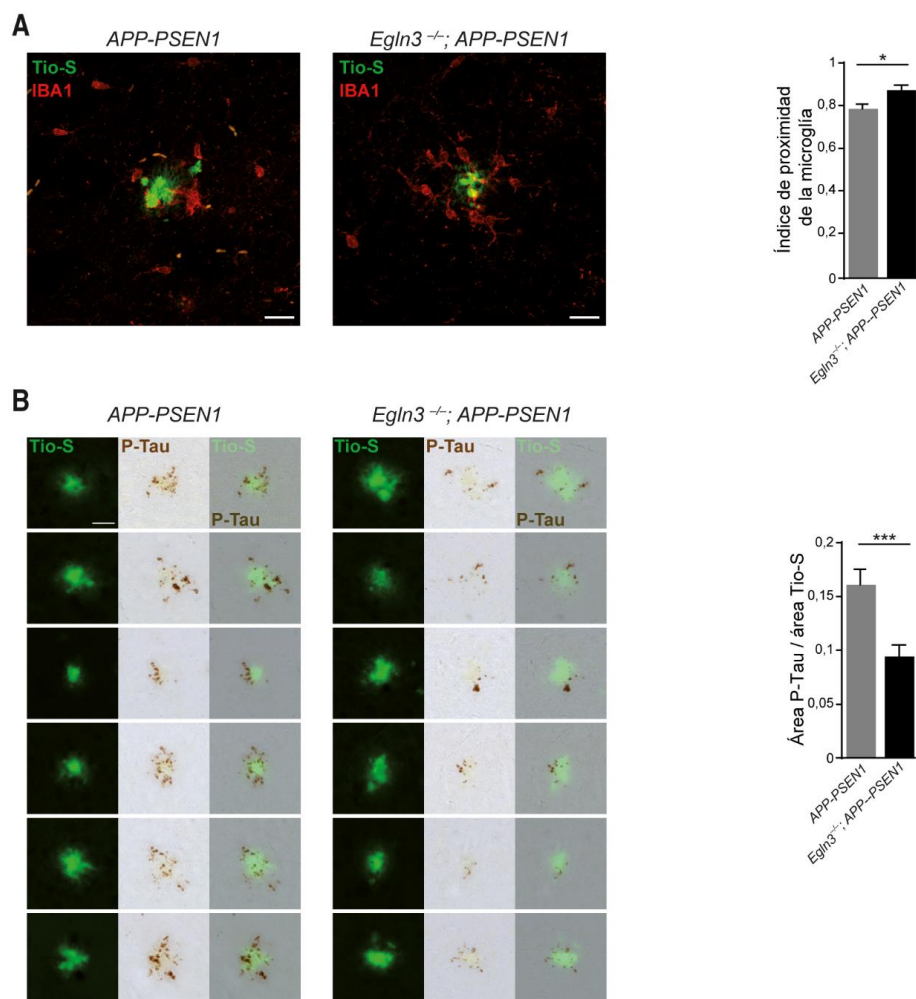


**Figura 7. La hipoxia crónica aumenta la distrofia axonal asociada a Aβ.** Ratones modelos de la EA, *APP-PSEN1*, de 14 meses de edad expuestos a condiciones de normoxia (21% O<sub>2</sub>) o hipoxia (9% O<sub>2</sub>) durante 21 días. **(A)** Secciones corticales inmunoteñidas para ubiquitina (UB; paneles derechos) y contrateñidas con Tio-S (paneles izquierdos). Las barras de escala son de 100 μm. La gráfica inferior muestra la cuantificación del porcentaje total de carga de UB por sección en normoxia (N; barra gris) e hipoxia (H; barra azul). Se representa la media ± error estándar de la media (n = 8; 4 ratones por grupo; \* p < 0,05; prueba t de Student). **(B)** Secciones corticales inmunoteñidas para fosfo-TAU (p-TAU; paneles derechos) y contrateñidas con Tio-S (paneles izquierdos). Las barras de escala son de 20 μm. La gráfica inferior muestra el porcentaje de área de las placas de Aβ ocupado por neuritas p-TAU+ en normoxia (N; barra gris) e hipoxia (H; barra azul). Se representa la media ± error estándar de la media (n = 13-18; 4 ratones por grupo; \*\* p < 0,01; prueba t de Student).



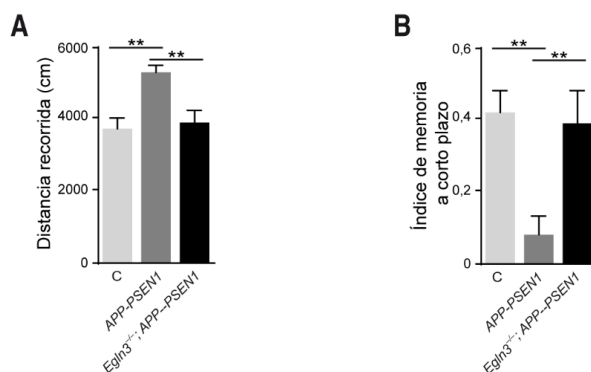


## INTRODUCCIÓN



**Figura 8. La ausencia de *Egl3* en el modelo murino de EA *APP-PSEN1* aumenta la cercanía de la microglía a las placas y disminuye las distrofías neuronales.** Ratones modelos *APP-PSEN1* y *Egl3<sup>-/-</sup>; APP-PSEN1* de 6 meses de edad. **(A)** Los paneles de la izquierda son imágenes de confocal de secciones coronales representativas teñidas con Tio-S (verde) y el marcador microglial IBA1 (rojo). Las barras de escala son de 20  $\mu$ m. El panel de la derecha muestra la gráfica del índice de proximidad de la microglía: proporción de células de microglía inmunoteñidas con el anticuerpo anti-IBA1 y el con el marcador nuclear DAPI que están en contacto con las placas de A $\beta$  dentro de un halo de 40  $\mu$ m alrededor de la placa en ratones *APP-PSEN1* (barra gris) y *Egl3<sup>-/-</sup>; APP-PSEN1* (barra negra). Se representa la media  $\pm$  error estándar de la media ( $n = 3$  ratones por grupo; 15 placas por ratón; \*  $p < 0,05$ ; prueba  $t$  de Student). **(B)** Los paneles de la izquierda son imágenes representativas de placas corticales compactas de A $\beta$  aleatorias normalizadas por área de placa teñidas con Tio-S (verde; columna izquierda de cada panel) y daño neuronal asociado inmunoteñido con anti-Tau fosforilado (p-Tau; marrón; columna central de cada panel). La columna de la derecha de cada panel muestra la colocación de los marcadores Tio-S y P-Tau. Las barras de escala son de 50  $\mu$ m. La gráfica de la derecha muestra la cuantificación del ratio del área ocupada por p-Tau por área de placa de A $\beta$  de las imágenes representadas en los paneles de la izquierda en ratones *APP-PSEN1* (barra gris) y *Egl3<sup>-/-</sup>; APP-PSEN1* (barra negra). Se representa la media  $\pm$  error estándar de la media ( $n = 5$  ratones por grupo; 24 placas por ratón; \*\*\*  $p < 0,001$ ; prueba  $t$  de Student).





**Figura 9. La ausencia de *Egln3* en el modelo de la EA *APP-PSEN1* rescata los defectos motores y de memoria a corto plazo asociados a la EA. (A)** La actividad espontánea se midió en ratones de 6 meses de edad controles (C, WT y *Egln3*<sup>-/-</sup>; barra gris clara), *APP-PSEN1* (barra gris oscura) y *Egln3*<sup>-/-</sup>; *APP-PSEN1* (barra negra). Los ratones fueron grabados durante 15 minutos en un cubículo de campo abierto. Se representa la media  $\pm$  error estándar de la media ( $n = 14-18$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; test ANOVA seguido del test de *Tukey*). **(B)** Se calculó el índice de memoria a corto plazo (1 hora de intervalo entre sesión) en ratones de 6 meses de edad controles (C, WT y *Egln3*<sup>-/-</sup>; barra gris clara), *APP-PSEN1* (barra gris oscura) y *Egln3*<sup>-/-</sup>; *APP-PSEN1* (barra negra) usando el test de reconocimiento de objetos. Se representa la media  $\pm$  error estándar de la media ( $n = 14-21$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; test ANOVA seguido del test de *Newman-Keuls*).



ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**000008745e2000018471**

CSV

**GEISER-8c71-b684-c79b-42f3-954b-6885-3060-b995**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular**



GEISER-8c71-b684-c79b-42f3-954b-6885-3060-b995



## OBJETIVOS

ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**000008745e2000018471**

CSV

**GEISER-8c71-b684-c79b-42f3-954b-6885-3060-b995**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular**



GEISER-8c71-b684-c79b-42f3-954b-6885-3060-b995

ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**000008745e2000018471**

CSV

**GEISER-8c71-b684-c79b-42f3-954b-6885-3060-b995**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular**



GEISER-8c71-b684-c79b-42f3-954b-6885-3060-b995

## 2. OBJETIVOS

---

### 2.1. HIF1 EN LA MICROGLÍA DE LA EA

Estudiar el papel de HIF1 y su vía de señalización en la microglía de la EA.

### 2.2. PHD3 EN LA MICROGLÍA DE LA EA

Estudiar la vía de señalización mediada por PHD3 en la microglía de la EA.



ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**000008745e2000018471**

CSV

**GEISER-8c71-b684-c79b-42f3-954b-6885-3060-b995**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular**



GEISER-8c71-b684-c79b-42f3-954b-6885-3060-b995

## RESULTADOS

ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**000008745e2000018471**

CSV

**GEISER-8c71-b684-c79b-42f3-954b-6885-3060-b995**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular**



GEISER-8c71-b684-c79b-42f3-954b-6885-3060-b995

ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**000008745e2000018471**

CSV

**GEISER-8c71-b684-c79b-42f3-954b-6885-3060-b995**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular**



GEISER-8c71-b684-c79b-42f3-954b-6885-3060-b995

## 3. RESULTADOS

Para facilitar la organización y comprensión la sección de resultados se presenta según los objetivos planteados.

### 3.1. OBJETIVO 1: HIF1 EN LA MICROGLÍA DE LA EA

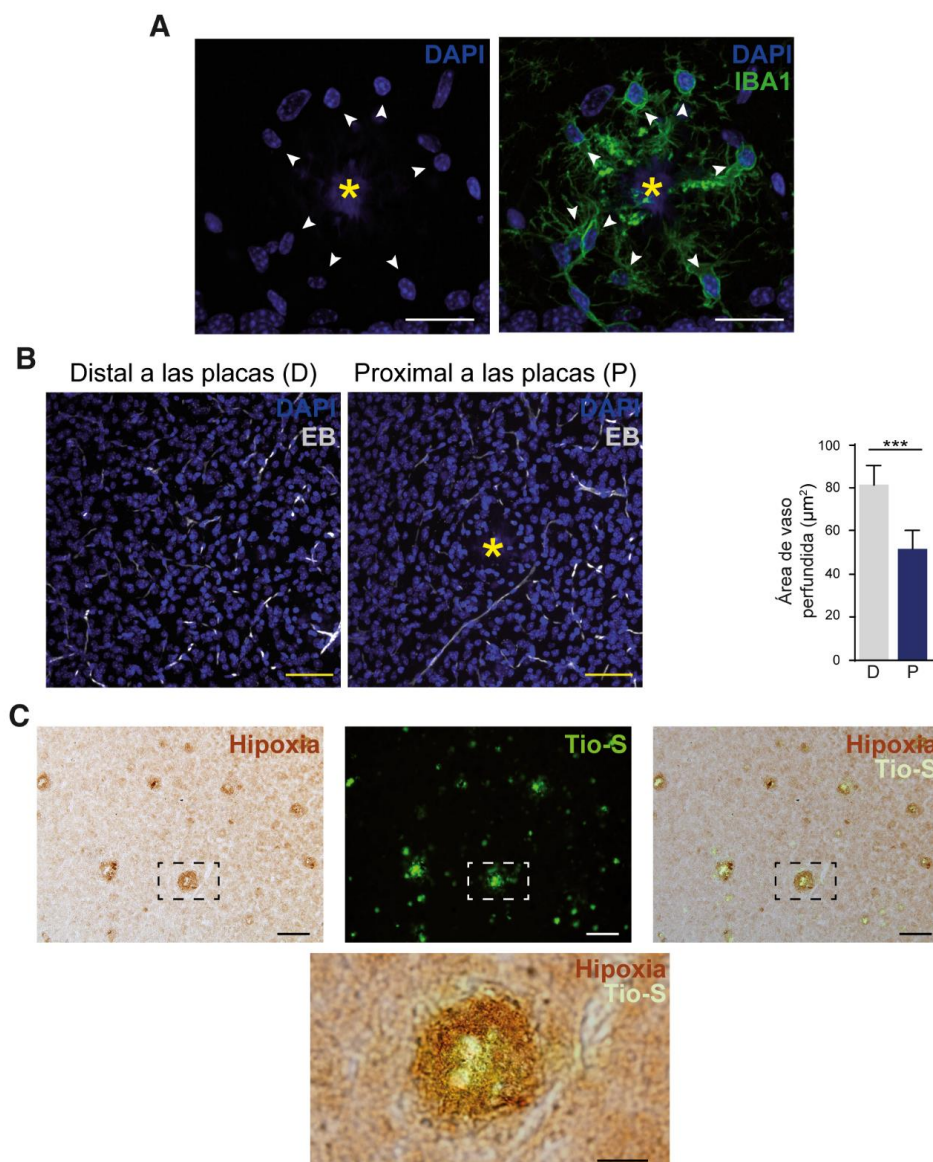
#### 3.1.1. Las células que rodean a las placas de A $\beta$ están hipoperfundidas e hipóxicas y tienen una elevada expresión de HIF1

La actividad persistente de los focos de células inmunes innatas normalmente induce hipoxia inflamatoria e hipoperfusión (De Bock et al., 2009; Eltzschig & Carmeliet, 2011). La microglía migra y se agrupa alrededor de las placas seniles (Serrano-Pozo et al., 2013). En rodajas de cerebro de ratones *APP-PSEN1* de 8 meses de edad se observó que las células de microglía constituyen la primera línea celular de defensa contra las placas de A $\beta$  (**Figura 10A**). La microvasculatura se encuentra muy alterada en las proximidades de las placas amiloides (Kalaria, 1997; Kawai et al., 1990, 1992; Kouznetsova et al., 2006; Lee et al., 2005; Meyer et al., 2008; Nortley et al., 2019; Sengillo et al., 2013; Sweeney et al., 2018), sugiriendo que las células cercanas pueden estar bajo privación de O<sub>2</sub> y nutrientes. En concordancia, se encontró una disminución significativa de la perfusión en las proximidades de las placas de A $\beta$  en comparación con las áreas más distales (**Figura 10B**). Estos experimentos fueron realizados por mis compañeras María Isabel Álvarez Vergara y Alicia Elena Rosales Nieves. También se observó una notable colocalización de la inmunoreactividad del pimonidazol, un marcador hipóxico (Raleigh et al., 1999), alrededor de los depósitos amiloides de núcleo denso que son positivos para el marcaje con Tio-S (**Figura 10C**).

Para demostrar que las regiones que rodean a las placas de A $\beta$  son hipóxicas, primero se estudió la expresión de *Hif1a* mediante hibridación *in situ* (ISH; del inglés, *in situ hybridization*) y encontramos que las células situadas alrededor de las placas de A $\beta$  tenían una marcada expresión del ARNm de *Hif1a* (**Figura 11A**). Luego se combinó la ISH con inmunofluorescencia para el marcador microglial IBA1, y reveló que la A $\beta$ AM, el tipo celular más cercano encontrado alrededor de las placas de A $\beta$  (**Figura 10A**), expresaba altos niveles del ARNm de *Hif1a* (**Figura 11A**), mientras que en las células microgliales situadas más alejadas de los depósitos de A $\beta$  no se observó alta expresión del ARNm de *Hif1a* (**Figura 11**), lo que indica que *Hif1a* está sobreexpresado en la A $\beta$ AM.



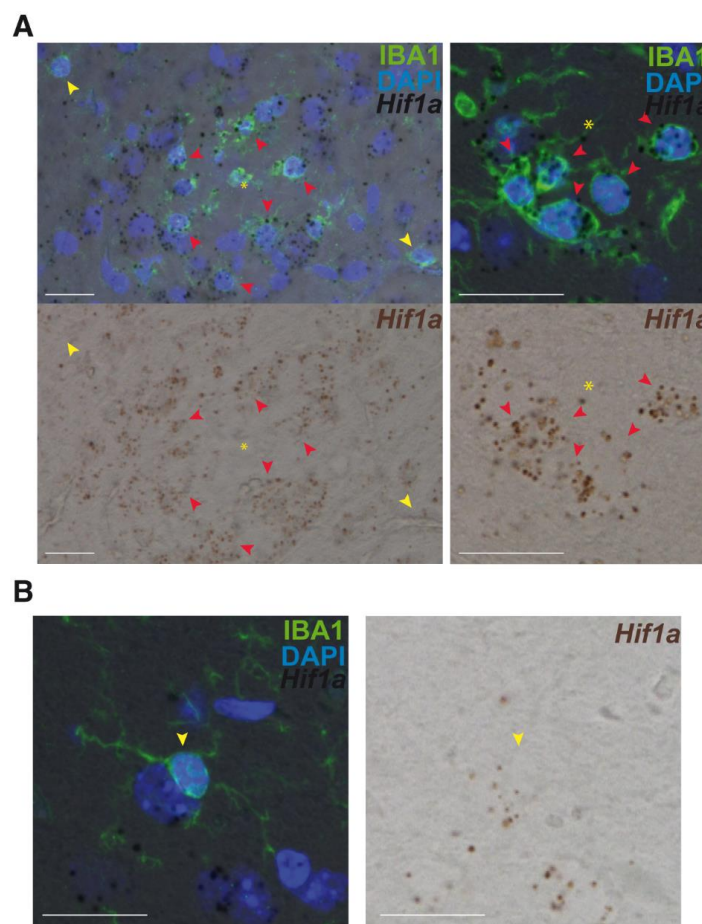
## RESULTADOS



**Figura 10. Las placas de A $\beta$  están rodeadas de microglía y son áreas hipoperfundidas e hipóxicas. (A)** Secciones coronales representativas de cerebros de ratones *APP-PSEN1* de 8 meses de edad teñidas con el marcador microglial IBA1 (verde) y el marcador nuclear DAPI (azul). Las puntas de flechas blancas indican los núcleos de las células microgliales y el asterisco amarillo marca la posición de la placa de A $\beta$ . Las barras de escala son de 20  $\mu$ m. **(B)** Los paneles izquierdos muestran imágenes representativas de confocal (0,5  $\mu$ m en el eje Z) de secciones coronales de cerebros de ratones *APP-PSEN1* de 8 meses de edad inyectados con *Evans Blue* (EB; blanco) y teñidas con el marcador nuclear DAPI (azul). El asterisco amarillo indica el lugar donde está situada la placa de A $\beta$ . Las barras de escala son de 20  $\mu$ m. La gráfica de la derecha muestra la cuantificación del área perfundida en zonas adyacentes del cerebro donde las placas de A $\beta$  están distales (D) o próximas (P). Se representa la media  $\pm$  error estándar de la media ( $n = 40$  pares de imágenes por grupo experimental de 5 ratones diferentes; \*\*\*  $p < 0,001$ ; prueba  $t$  de Student). **(C)** Secciones coronales representativas de cerebros de ratones *APP-PSEN1* de 14 meses de edad tratados con *Hypoxiprobe* (Pimonidazole HCl; 60 mg/kg intraperitoneal; 45 min) que muestran hipoxia (marrón; inmunoperoxidasa; DAB) en la proximidad de las placas de A $\beta$  teñidas con Tio-S (verde). El recuadro punteado se muestra en el panel inferior. Las barras de escala son de 100  $\mu$ m y 25  $\mu$ m respectivamente en las imágenes de bajo y alto aumento.







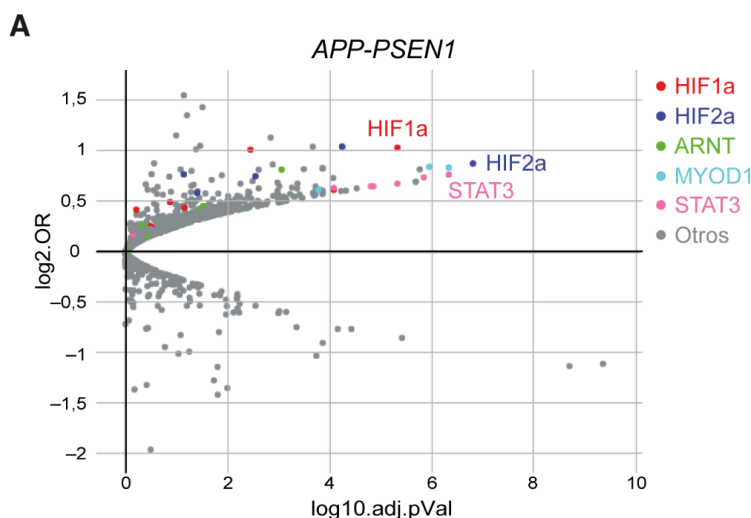
**Figura 11. La expresión del ARNm de *Hif1a* en microglía se restringe a la zona cercana a depósitos amiloides.** Imágenes representativas de secciones coronales de cerebros de ratones *APP-PSEN1* de 8 meses tras ISH con sonda *Hif1a* (marrón), inmunotinción con anticuerpo anti-IBA1 (verde) y tinción nuclear con DAPI (azul). Los asteriscos indican la posición de las placas amiloides. Las barras de escala son de 20  $\mu$ m. **(A)** Los paneles superiores muestran los marcadores fluorescentes IBA1 y DAPI y la sonda *Hif1a*. Los paneles inferiores muestran la sonda *Hif1a* en campo claro. Las puntas de flechas rojas indican células microgliales cercanas a placa con una fuerte expresión de *Hif1a*, y las puntas de flechas amarillas indican células microgliales no asociadas a depósitos de A $\beta$ . Los paneles de la izquierda muestran una imagen de bajo aumento de la microglía que rodea a la placa amiloide y que se sitúa lejos de ella. En los paneles de la derecha se muestra una imagen de alto aumento de la microglía rodeando a una placa de A $\beta$ . **(B)** El panel izquierdo muestra los marcadores fluorescentes IBA1 y DAPI y la sonda *Hif1a*. El panel derecho muestra la sonda *Hif1a* en campo claro. Se muestra una imagen de alto aumento de la microglía situada lejos de placa (punta de flecha amarilla).

Para verificar si el incremento de expresión del ARNm de *Hif1a* tiene consecuencias funcionales sobre la transcripción de la A $\beta$ AM, se utilizó el análisis de enriquecimiento de factor de transcripción (TFEA; del inglés, *transcription factor enrichment analysis*) (Puente-Santamaría & Del Peso, 2018), que emplea 1122 conjuntos de datos de secuenciación de cromatina inmunoprecipitada (ChIP-seq; del inglés, *chromatin immunoprecipitation sequencing*) que cubren 331 factores de transcripción humanos diferentes. Encontramos que tanto HIF1 $\alpha$  como HIF2 $\alpha$



## RESULTADOS

estaban entre las principales proteínas que regulan la transcripción microglial en ratones *APP-PSEN1* (Figura 12 y Tabla suplementaria 1), sugiriendo un papel preponderante de la transcripción mediada por HIF en la microglía de modelos murinos que depositan A $\beta$ . Interesantemente, STAT3, un factor de transcripción que incrementa la expresión de HIF1 a través de mTOR en hipoxia (Dodd et al., 2015), también fue detectado en nuestro TFEA (Figura 12 y Tabla suplementaria 1).



**Figura 12. La transcripción de la A $\beta$ AM está mediada por HIF.** TFEA de la microglía de ratones *APP-PSEN1* de 15-18 meses de edad (Orre et al., 2014a). Cada punto en el gráfico de volcán representa un experimento de Chip-seq individual.

En conjunto, estos datos sugieren, que el área que rodea a las placas de A $\beta$  está hipóxica e hipoperfundida y caracterizada por la expresión de HIF1 en las células cercanas.

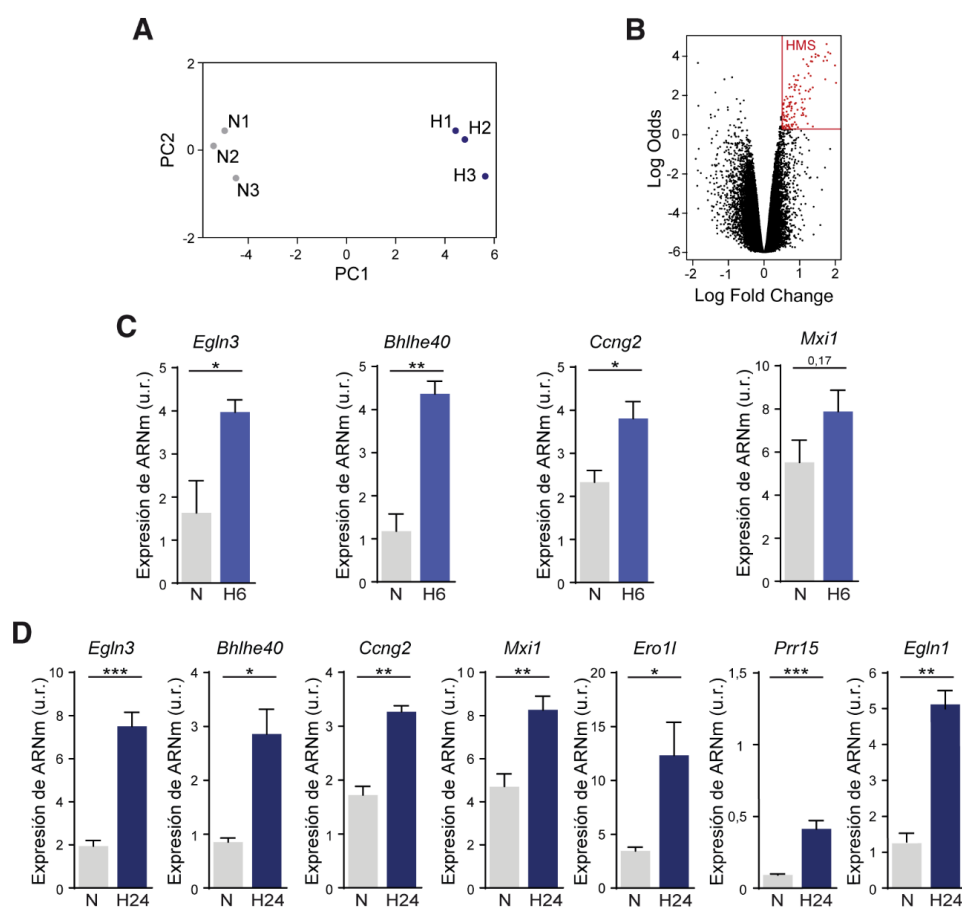
### 3.1.2. La firma hipóxica de la microglía está incrementada en la A $\beta$ AM y su expresión es dependiente de HIF1

Una vez conocido que las células microgliales que se encuentran alrededor de las placas de A $\beta$  están bajo condiciones de hipoxia e hipoperfusión, y que HIF1 es uno de los principales factores de transcripción implicados en la regulación de la transcripción de la A $\beta$ AM, se decidió definir cuál es la firma hipóxica de la microglía (HMS; del inglés, *hypoxia microglia signature*) y si los genes contenidos en ella estaban regulados por HIF1. Para ello inicialmente se expusieron cultivos primarios de microglía de ratón a condiciones de normoxia (21% O<sub>2</sub>) o de hipoxia (1% O<sub>2</sub>) durante 6 horas, y mediante el uso de microarrays se determinaron aquellos genes que regulan su expresión por bajas concentraciones de O<sub>2</sub>. El análisis de componentes principales mostró una clara separación entre las muestras de los cultivos expuestos a condiciones de normoxia y las



## RESULTADOS

muestras de los expuestos a condiciones de hipoxia (**Figura 13A**), y aquellos genes diferencialmente expresados (DE) en las muestras de los cultivos expuestos a condiciones de hipoxia con respecto a las de los cultivos expuestos a condiciones de normoxia se clasificaron de acuerdo con el siguiente criterio: los cambios transcripcionales se consideraron estadísticamente significativos cuando  $|\text{logaritmo de fold change (log FC)}| > 0,5$  y el  $p\text{-valor (p)} < 0,05$  (**Tabla suplementaria 2**).



**Figura 13. La exposición a hipoxia produce cambios transcripcionales en la microglía.** (A) Análisis de componentes principales mostrando la separación entre réplicas biológicas de cultivos primarios de microglía de ratón expuestos a condiciones de normoxia (N; 21% O<sub>2</sub>; puntos grises) o hipoxia (H; 1% O<sub>2</sub>; puntos azules) durante 6 horas. (B) Gráfico de volcán mostrando los genes incluidos en la HMS (puntos rojos; log FC > 0,5; p < 0,01; rectángulo rojo). (C) qRT-PCR de los genes *Egln3*, *Bhlhe40*, *Ccng2* y *Mxi1* en muestras de cultivos primarios de microglía expuestos a condiciones de normoxia (N; 21% O<sub>2</sub>; barra gris) o hipoxia (H6; 1% O<sub>2</sub>; barra azul clara) durante 6 horas. Se usó *Hmbs* como gen control. Se representa la media ± error estándar de la media (u.r. unidades relativas). (n = 3; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; prueba t de Student). (D) qRT-PCR de los genes *Egln3*, *Bhlhe40*, *Ccng2*, *Mxi1*, *Ero1l*, *Prr15*, y *Egln1* en muestras de cultivos primarios de microglía expuestos a condiciones de normoxia (N; 21% O<sub>2</sub>; barra gris) o hipoxia (H24; 1% O<sub>2</sub>; barra azul oscura) durante 24 horas. Se usó *Hmbs* como gen control. Se representa la media ± error estándar de la media (u.r. unidades relativas). (n = 3-6; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001; prueba t de Student).



## RESULTADOS

Entre los genes DE en las muestras de los cultivos primarios de microglía expuestos a condiciones de hipoxia con respecto a las de cultivos expuestos a condiciones de normoxia, se definió la HMS, que contiene a aquellos genes que incrementan su expresión y que cumplen con el siguiente criterio:  $\log FC > 0,5$  y  $p < 0,01$  (**Figura 13B** y **Tabla suplementaria 3**). La expresión del ARNm de algunos de los genes contenidos en la HMS, se midió mediante qRT-PCR en muestras de cultivos primarios expuestos a condiciones de hipoxia o de normoxia durante 6 horas. Concretamente se midió la expresión del ARNm de *Egln3*, *Bhlhe40*, *Ccng2* y *Mxi1*, observándose un incremento estadísticamente significativo de la expresión en *Egln3*, *Bhlhe40* y *Ccng2* y una tendencia al aumento en *Mxi1* (**Figura 13C**). Además, la expresión del ARNm de estos genes junto con el de otros que también están incluidos en la HMS, como son *Ero1l*, *Prr15* y *Egln1*, también se midió en muestras de cultivos primarios de microglía expuestos a condiciones de normoxia o de hipoxia durante 24 horas. En este caso todos los genes mostraron un incremento estadísticamente significativo de su expresión (**Figura 13D**).

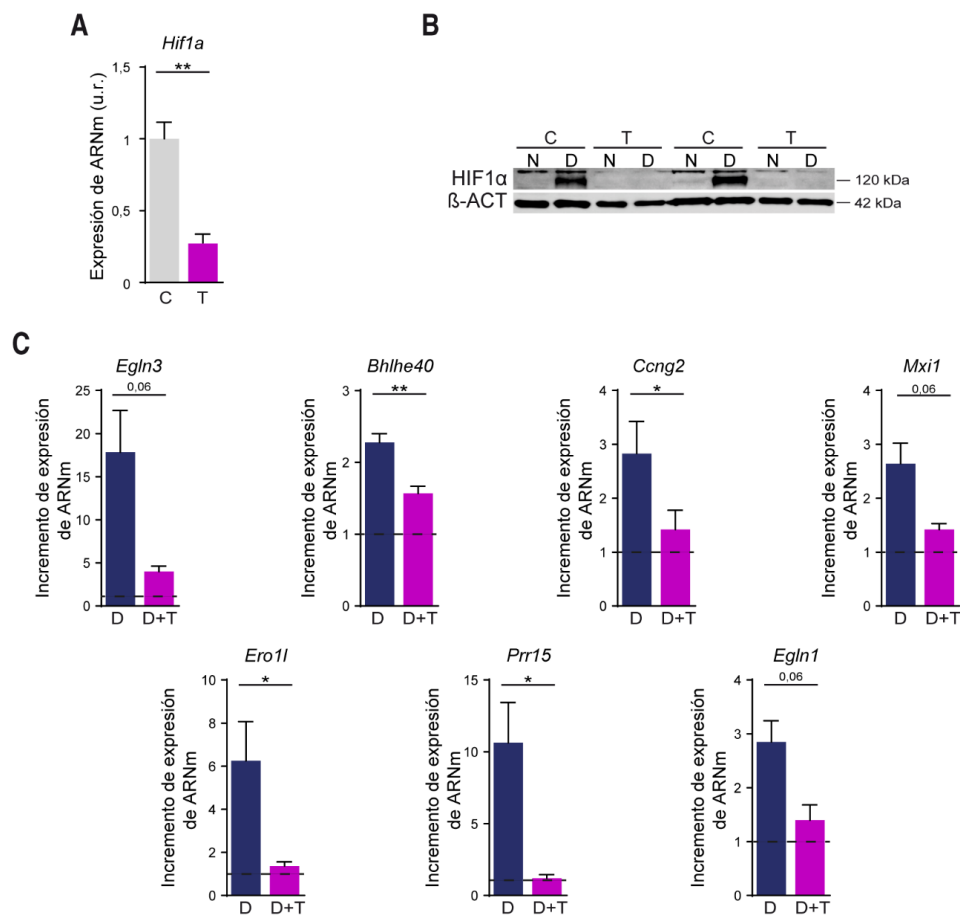
Puesto que HIF regula la respuesta al estrés hipóxico (Kaelin & Ratcliffe, 2008), está implicado en la activación de las células del sistema inmune innato periférico (Imtiyaz & Simon, 2010) y además hemos predicho que regula la transcripción en la AβAM (**Figura 12**), se decidió explorar si HIF1 era el responsable de la regulación de la transcripción de los genes de la HMS.

Para ello se usaron muestras de cultivos primarios de microglía de los ratones *Cx3cr1-Cre::ERT2; Hif1a<sup>Flox/Flox</sup>*, que eliminan *Hif1a* de manera condicional y específica en las células del sistema inmune innato en presencia de tamoxifeno (TMX). El tratamiento *in vitro* con TMX usado a una concentración de 100 nM durante 144 horas, provocó una disminución de los niveles de expresión del ARNm de *Hif1a* del 73% (**Figura 14A**). Además, la proteína HIF1α no se detectó por WB en los cultivos primarios de microglía de los ratones *Cx3cr1-Cre::ERT2; Hif1a<sup>Flox/Flox</sup>* tratados con TMX, a pesar de que fueron también incubados con el inhibidor de PHD dimetiloxalilglicina (DMOG) para estabilizar HIF1α (**Figura 14B**).

Mediante qRT-PCR se midió la expresión del ARNm de varios genes representativos incluidos en la HMS, como *Egln3*, *Bhlhe40*, *Ccng2*, *Mxi1*, *Ero1l*, *Prr15* y *Egln1*, en las muestras de los cultivos primarios de microglía de los ratones *Cx3cr1-Cre::ERT2; Hif1a<sup>Flox/Flox</sup>* tratados con TMX y/o DMOG. Se pudo observar que la reducción de la expresión de HIF1α mediante el tratamiento con TMX mitigó el incremento producido por DMOG, llegando a ser esta disminución estadísticamente significativa en *Bhlhe40*, *Ccng2*, *Ero1l* y *Prr15* y observándose una tendencia a la disminución en el resto de los genes (**Figura 14C**).



## RESULTADOS



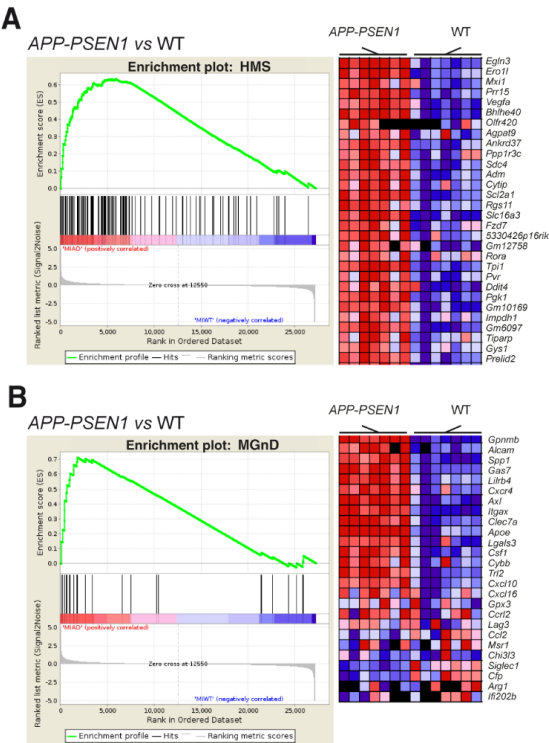
**Figura 14. El tratamiento con TMX reduce los niveles de expresión a nivel de ARNm y de proteína de HIF1α, que regula la actividad transcripcional de los genes inducidos por hipoxia en muestras de cultivos primarios de microglía.** (A) qRT-PCR del gen *Hif1a* en muestras de cultivos primarios de microglía de ratones *Cx3cr1-Cre::ERT2; Hif1a<sup>Flox/Flox</sup>* tratados con vehículo (C; barra gris) o TMX (T; 100 nM; 144 h; barra magenta). Se usó *Hmbs* como gen control. Se representa la media ± error estándar de la media (u.r. unidades relativas). (n = 7; \*\* p < 0,01; prueba t de Student). (B) Imágenes representativas de WB para la proteína HIF1α con β-actina (β-ACT) como control de carga en muestras de cultivos primarios de microglía de ratones *Cx3cr1-Cre::ERT2; Hif1a<sup>Flox/Flox</sup>* tratados con vehículo (C) o TMX (T; 100 nM; 144 h) en condiciones de normoxia (N; 21% O<sub>2</sub>; 24 h) o con DMOG (D; 0,1 mM; 24 h). (C) qRT-PCR de los genes *Egln3*, *Bhlhe40*, *Ccng2*, *Mxi1*, *Ero1l*, *Prr15*, y *Egln1* en muestras de cultivos primarios de microglía de ratones *Cx3cr1-Cre::ERT2; Hif1a<sup>Flox/Flox</sup>* tratados con vehículo, DMOG (D; 0,1 mM; 24 h), TMX (T; 100 nM; 144 h), o DMOG y TMX. Se muestra el incremento de expresión del ARNm de las muestras tratadas con DMOG versus vehículo (D; barra azul) y de las muestras tratadas con DMOG+TMX versus TMX (D+T; barra magenta). Se usó *Hmbs* como gen control y las líneas punteadas representan no inducción. Se representa la media ± error estándar de la media (n = 3-6; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; prueba t de Student).

Una vez comprobado que HIF1α era el responsable de la regulación transcripcional de los genes de la HMS en cultivos primarios de microglía de ratón, se estudió si esta firma hipóxica estaba incrementada en la AβAM del modelo murino de EA que deposita Aβ *APP-PSEN1*. Para ello, a partir de los datos previamente publicados de la microglía aislada mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS; del inglés, *fluorescence activated cell sorting*) de este



RESULTADOS

modelo (15-18 meses de edad) (Orre et al., 2014a), se realizó un análisis de enriquecimiento de conjunto de genes (GSEA; del inglés, *gene set enrichment analysis*), una herramienta que nos permite realizar una comparación equitativa entre conjuntos de datos de expresión génica independientes (Subramanian et al., 2005). Se usó la categoría “*Biological Processes*” en la que se incluyó además del conjunto de genes (GS; del inglés, *gene set*) “HMS”, previamente definido (Figura 13B y Tabla suplementaria 3), el GS “MGnD”, compuesto por aquellos genes comunes encontrados en diferentes modelos de DAM y que conforman el conocido como fenotipo neurodegenerativo de la microglía (Tabla suplementaria 4) (Holtman et al., 2015; Keren-Shaul et al., 2017; Krasemann et al., 2017). Se observó que tanto el GS “HMS” como el GS “MGnD” estaban enriquecidos en la microglía del modelo murino *APP-PSEN1* (Figura 15 y Tabla 1), siendo el GS “HMS” el que mostró mayor incremento de su expresión. Estos datos nos indican que la microglía de este modelo murino está activa y que la transcripción mediada por hipoxia es una prominente firma genética de la respuesta microglial a la acumulación de Aβ.



**Figura 15. Los GSs “HMS” y “MGnD” están incrementados en la microglía del modelo murino de EA *APP-PSEN1*.** Comparación de expresiones globales en muestras de microglía aislada del modelo murinos de la EA *APP-PSEN1* versus ratones WT de 15-18 meses de edad (Orre et al., 2014a) mediante GSEA. Los gráficos de la izquierda muestran enriquecimiento de diferentes GSs y los paneles de la derecha muestran el *heat map* de los genes más enriquecidos en cada caso, simbolizando el rojo incremento de expresión y el azul disminución de expresión. **(A)** GSEA mostrando el enriquecimiento del GS “HMS” en la comparación entre muestras de microglía aislada de ratones *APP-PSEN1* versus WT. **(B)** GSEA mostrando el enriquecimiento del GS “MGnD” en la





## RESULTADOS

comparación entre muestras de microglía aislada de ratones *APP-PSEN1* versus WT.

GS	Size	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	Rank at max	Leading edge
HMS	110	0.63	2.01	0.000	0.119	0.088	5908	tags=54%, list=22%, signal=68%
GO LIPID HOMEOSTASIS	102	0.58	1.85	0.000	1.000	0.815	2782	tags=18%, list=10%, signal=20%
GO POSITIVE REGULATION OF T CELL MEDIATED IMMUNITY	28	0.71	1.81	0.000	1.000	0.956	1941	tags=29%, list=7%, signal=31%
GO POSITIVE REGULATION OF TYROSINE PHOSPHORYLATION OF STAT5 PROTEIN	15	0.80	1.78	0.006	1.000	0.992	1851	tags=47%, list=7%, signal=50%
MGnD	26	0.71	1.7	0.004	1.000	0.999	1820	tags=50%, list=7%, signal=54%

**Tabla 1. Los 5 GSs de la categoría “Biological Processes” que más incrementan su expresión en la microglía aislada de ratones *APP-PSEN1* versus WT.** Los 5 GSs que más incrementan su expresión en la microglía aislada mediante FACS de ratones de 15-18 meses de edad *APP-PSEN1* versus WT (Orre et al., 2014a) revelado por GSEA.

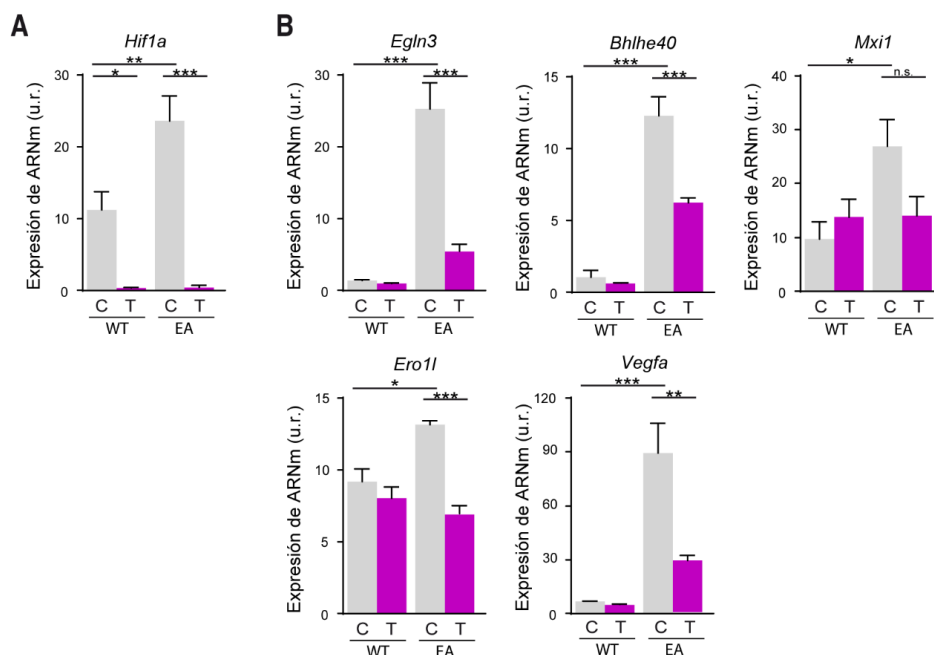
A continuación, se estudió si HIF1 era el responsable de la regulación transcripcional de los genes de la HMS en la microglía de los modelos murinos de la EA que depositan A $\beta$ . Para ello se usó un ratón *APP-PSEN1* en el que *Hif1a* se elimina específicamente en la microglía tras el tratamiento con TMX (*Cx3cr1-Cre::ERT2; Hif1a<sup>Flox/Flox</sup>; APP-PSEN1*). Para comprobar que el TMX producía el efecto deseado se trataron con TMX durante 30 días ratones de 2 meses de edad *Cx3cr1-Cre::ERT2; Hif1a<sup>Flox/Flox</sup>* y *Cx3cr1-Cre::ERT2; Hif1a<sup>Flox/Flox</sup>; APP-PSEN1*, y su microglía se examinó a los 12 meses de edad. Mediante qRT-PCR en muestras de microglía aislada por FACS, se midió la expresión del ARNm de *Hif1a* a los 9 meses de la finalización del tratamiento con TMX, observándose una drástica disminución de su expresión en ambos ratones, así como también se pudo observar un incremento de la expresión en la microglía de los ratones *Cx3cr1-Cre::ERT2; Hif1a<sup>Flox/Flox</sup>; APP-PSEN1* no tratados con TMX con respecto a microglía de los ratones *Cx3cr1-Cre::ERT2; Hif1a<sup>Flox/Flox</sup>* no tratados (**Figura 16A**). La estrategia de selección empleada para aislar la microglía puede observarse en el apartado de materiales y métodos (**Figura 47**).

Tras comprobar que había una disminución de los niveles de expresión del ARNm de *Hif1a* tras el tratamiento con TMX, se midieron en las mismas muestras de microglía aislada mediante FACS los niveles de expresión del ARNm de algunos genes representativos contenidos en la HMS como son *Egln3*, *Vegfa*, *Bhlhe40*, *Ero1l* y *Mxi1*. Se observó un incremento de la expresión en la microglía



## RESULTADOS

de los ratones *Cx3cr1-Cre::ERT2; Hif1a<sup>Flox/Flox</sup>; APP-PSEN1* no tratados con TMX con respecto a microglía de los ratones *Cx3cr1-Cre::ERT2; Hif1a<sup>Flox/Flox</sup>* no tratados, y este incremento de expresión se vio totalmente (*Ero1l* y *Mxi1* -una tendencia no significativa-) o parcialmente (*Egln3*, *Vegfa* y *Bhlhe40*) mitigado en la microglía deficiente en *Hif1a* (Figura 16B).



**Figura 16. La acumulación de Aβ induce la expresión mediada por HIF1 de genes de la HMS.** qRT-PCR en muestras de microglía CD11b+/CD45+ aislada mediante FACS de ratones de 12 meses de edad *Cx3cr1-Cre::ERT2; Hif1a<sup>Flox/Flox</sup>* (WT) o *Cx3cr1-Cre::ERT2; Hif1a<sup>Flox/Flox</sup>; APP-PSEN1* (EA) tratados con vehículo (C; barra gris) o TMX (T; 30 d; barra magenta). (A) qRT-PCR del gen *Hif1a*. Se usó *Hmbs* como gen control. Se representa la media ± error estándar de la media (u.r. unidades relativas). (n = 3-4; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001; test ANOVA seguido del test de Tukey). (B) qRT-PCR de los genes *Egln3*, *Bhlhe40*, *Mxi1*, *Ero1l* y *Prr15*. Se usó *Hmbs* como gen control. Se representa la media ± error estándar de la media (u.r. unidades relativas). (n = 3-4; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001; test ANOVA seguido del test de Tukey).

Todos estos datos muestran que la HMS está incrementada en la AβAM, y que su regulación es dependiente de HIF1.

### 3.1.3. La coexistencia de la HMS y la OXPHOS define la AβAM

Se ha propuesto que un cambio del metabolismo en la AβAM de OXPHOS hacia glucólisis anaerobia mediante la activación de la vía de HIF1 a través de mTOR, mantiene las respuestas microgliales defensivas (Ulland et al., 2017; Wendeln et al., 2018). Se estudió la contribución de la vía de HIF1 en las respuestas defensivas microgliales en dos modelos de la EA que depositan Aβ, *APP<sub>751SL</sub>* y *5xfAD* (Wang et al., 2015) y donde la microglía genera grupos de células inmunes innatas *versus* otros 3 modelos donde la microglía no se agrupa, incluyendo un modelo de sobreproducción de





## RESULTADOS

TAU mutante asociado con demencia frontotemporal (*MAPT*p.P301S; Yoshiyama et al., 2007), un modelo de esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (*SOD1*p.G93A; Chiu et al., 2013), y ratones envejecidos (WT de 24 *versus* 5 meses de edad; Hickman et al., 2013) (**Figura 17**). Se combinaron estudios transcriptómicos de microglía aislada por FACS tanto de nueva generación como de datos previamente publicados con un GSEA. Como control se evaluaron las respuestas microgliales comunes encontradas en todas las DAM “MGnD” (**Tabla suplementaria 4**) (Holtman et al., 2015; Keren-Shaul et al., 2017; Krasemann et al., 2017) (**Figura 17**), y además también la vía de HIF1 usando el GS “HMS” (**Figura 13B** y **Tabla suplementaria 3**). Estos experimentos se llevaron a cabo en colaboración con Carmen Romero Molina del grupo del Dr. Javier Vitorica de la Universidad de Sevilla.

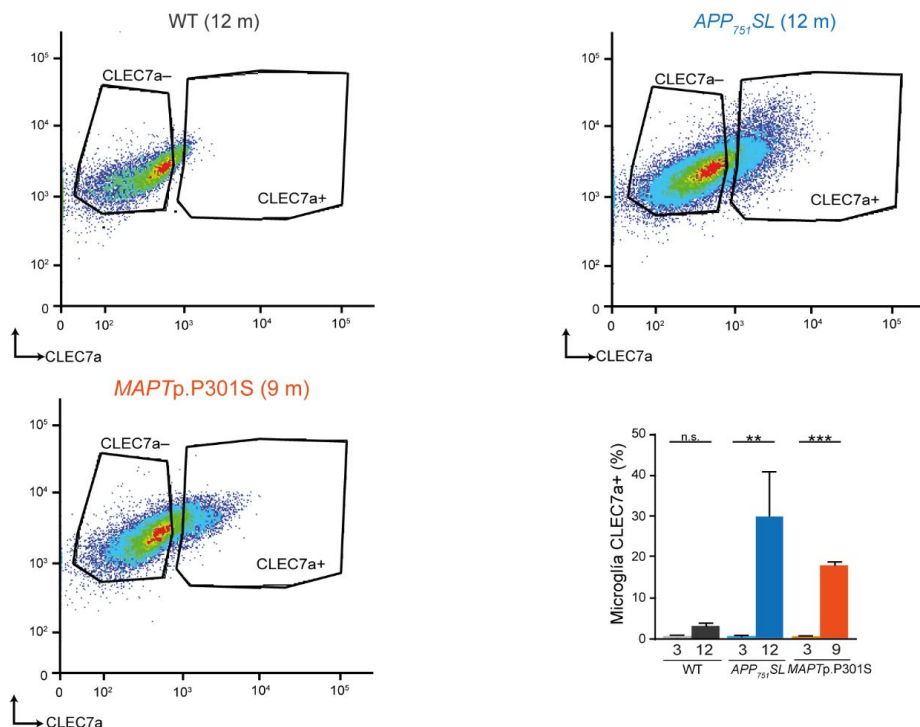
Estrategia de aislamiento									¿Agrupamiento celular?
		CD45 <sup>+</sup> ; CD11b <sup>+</sup> ; CLEC7a <sup>+</sup>				CD45 <sup>+</sup> ; CD11b <sup>+</sup>			
HM CLEC7a <sup>-</sup>		WT (3 m)	WT (12 m)	<i>APP</i> <sub>751</sub> <i>SL</i> (3 m)	<i>MAPT</i> p.P301S (3 m)	WT (8,5 m)	WT (130 d)	WT (5 m)	No
DAM (MGnD) CLEC7a <sup>+</sup>		<i>APP</i> <sub>751</sub> <i>SL</i> (12 m)				<i>5x</i> <i>fAD</i> (8,5 m)			Si
		<i>MAPT</i> p.P301S (9 m)				<i>SOD1</i> p.G93A (130 d)      WT (24 m)			No
		Este trabajo				Wang et al., 2015 Chiu et al., 2013 Hickman et al., 2013			

**Figura 17. Resumen de las diferentes poblaciones microgliales aisladas por FACS.** La microglía homeostática (HM) y la microglía asociada a enfermedad (DAM) están caracterizadas por la expresión negativa (-; marrón) y positiva (+; azul) de CLEC7a. El fenotipo neurodegenerativo microglial (MGnD) y la formación de agrupamientos celulares también se destacan en cada modelo. m: meses de edad; d: días de edad.

En primer lugar, se aisló la DAM de dos modelos de la EA, uno de deposición de A $\beta$  de 12 meses de edad (*APP*<sub>751</sub>*SL*) y otro de sobreproducción de TAU de 9 meses de edad (*MAPT*p.P301S) (**Figura 17**). Para ello se desarrolló un protocolo basado en la clasificación de células de microglía CD11b<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup> en subpoblaciones positivas y negativas para CLEC7a, un marcador muy expresado por la DAM (Holtman et al., 2015; Keren-Shaul et al., 2017; Krasemann et al., 2017) (**Figura 17**) y que forma parte del GS “MGnD” (**Tabla suplementaria 4**). La estrategia de selección empleada puede observarse en el apartado de materiales y métodos (**Figura 48**). Los niveles de CLEC7a estaban incrementados tanto en el modelo murino de deposición de A $\beta$  de 12 meses de edad como en el modelo de sobreproducción de TAU de 9 meses de edad (estado patológico), y permanecieron inalterados en la microglía aislada de ratones WT de la misma edad (**Figura 18**) así como en la microglía aislada de los modelos *APP*<sub>751</sub>*SL* y *MAPT*p.P301S de 3 meses de edad (estado pre-patológico) (**Figura 18**).



## RESULTADOS



**Figura 18. CLEC7a está incrementado en la microglía de los ratones *APP<sub>751</sub>SL* y *MAPT<sub>p.P301S</sub>* en estado patológico.** Gráficos representativos de densidad de citometría de flujo de muestras de microglía CD11b+/CD45+ aislada mediante FACS de ratones de diferentes genotipos, WT, *APP<sub>751</sub>SL* y *MAPT<sub>p.P301S</sub>* y edades (12 meses y 9 meses) con expresión de CLEC7a baja (CLEC7a-) o elevada (CLEC7a+). La gráfica de barras representa el porcentaje de microglía CLEC7a+ en cada grupo experimental: WT 3 y 12 meses (barras grises), *APP<sub>751</sub>SL* 3 y 12 meses (barras azules), *MAPT<sub>p.P301S</sub>* 3 y 9 meses (barras naranjas). Se representa la media  $\pm$  error estándar de la media ( $n = 4$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; test ANOVA seguido del test de Tukey).

En estas mismas muestras se realizaron estudios de microarray para explorar cuáles son los genes DE en la microglía de los ratones *APP<sub>751</sub>SL* versus WT de 12 meses de edad, *MAPT<sub>p.P301S</sub>* de 9 meses de edad versus WT de 12 meses de edad, y *APP<sub>751</sub>SL* de 12 meses de edad versus *MAPT<sub>p.P301S</sub>* de 9 meses de edad, teniendo en cuenta el siguiente criterio: los cambios transcripcionales se consideraron estadísticamente significativos cuando  $|\log FC| > 0,5$  y  $p < 0,05$  (Figura 19 y Tablas suplementarias 5, 6 y 7).

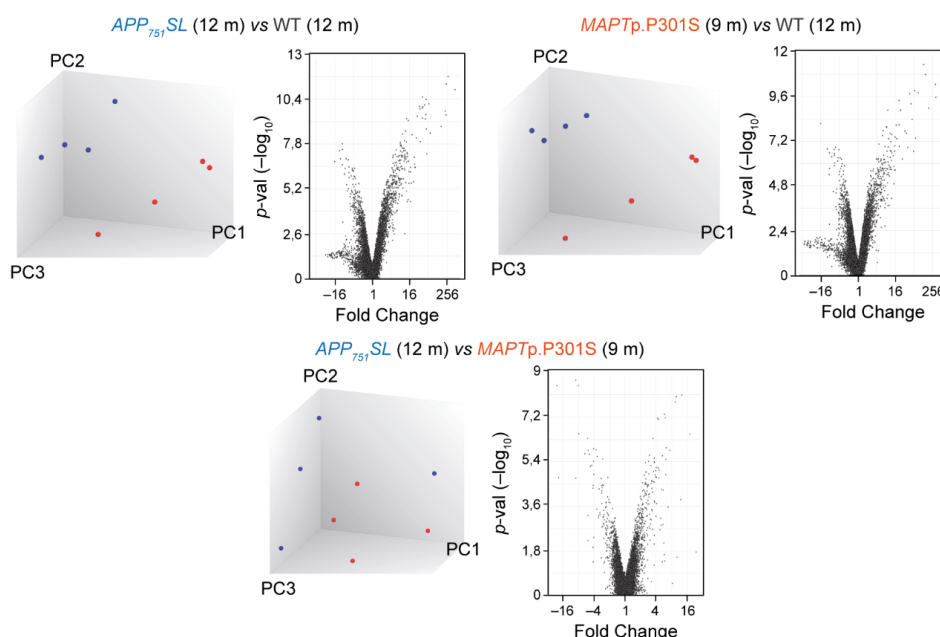
Seguidamente se realizaron estudios de GSEA usando la categoría “Biological Processes” en la que se incluyeron los GSs “HMS” y “MGnD”. Se observó que el GS “MGnD” estaba enriquecido tanto en la microglía CLEC7a+ del modelo *APP<sub>751</sub>SL* como en la del modelo *MAPT<sub>p.P301S</sub>* en estado patológico en comparación con la microglía de animales WT de la misma edad (Figura 20A y Tablas 2 y 3), mientras que en la comparación realizada con la microglía de los ratones *APP<sub>751</sub>SL* y *MAPT<sub>p.P301S</sub>* en estado pre-patológico versus la microglía de los animales WT, no se observó ningún GS que mostrara enriquecimiento con un FWER  $p\text{-val} < 0,05$ . Sin embargo, solo en la



## RESULTADOS

microglía del modelo murino *APP<sub>751</sub>SL* en estado patológico se pudo observar un enriquecimiento del GS “HMS” (**Figura 20B y Tabla 2**) y una comparación directa entre los genes DE en la microglía en estado patológico del modelo *APP<sub>751</sub>SL* versus el modelo *MAPT<sub>p</sub>.P301S* mostró que el GS “HMS” era el más enriquecido (**Figura 20C y Tabla 4**), a pesar de que estos dos modelos experimentales mostraron perfiles de transcripción globales similares (**Figura 19**) con un número reducido de genes DE (**Tabla suplementaria 7**). Cabe destacar que el GS “MGnD” no mostró una expresión diferencial entre la microglía de *APP<sub>751</sub>SL* versus a la microglía de *MAPT<sub>p</sub>.P301S*, descartando que exista un estado de activación diferente entre ambos modelos (**Tabla 4**).

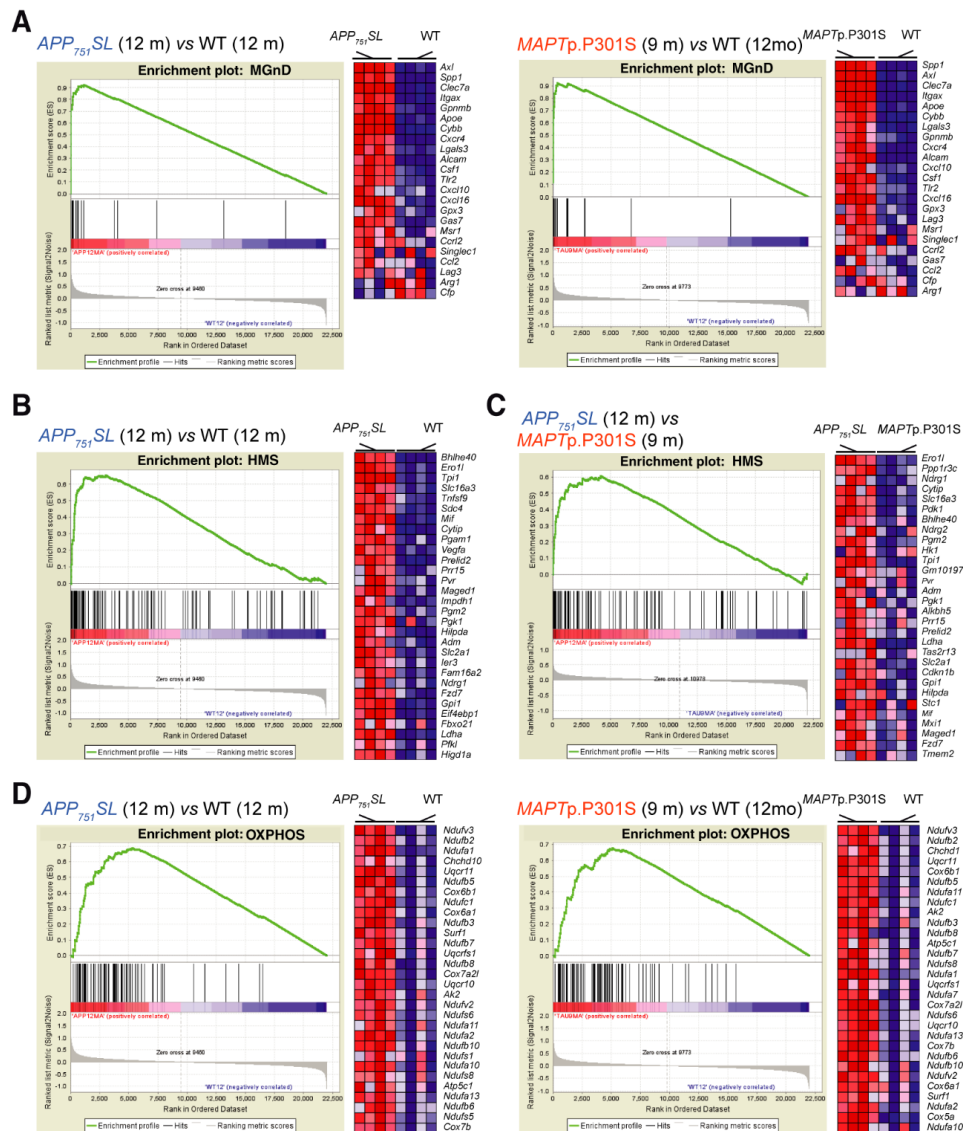
A pesar del alto enriquecimiento en genes regulados por HIF/hipoxia, el GS “OXPHOS” estaba muy enriquecido en ambos modelos neurodegenerativos (**Tablas 2 y 3**) y los gráficos de enriquecimiento revelaron un incremento de la expresión de los genes que codifican las proteínas de todos los complejos mitocondriales de la cadena de transporte de electrones (complejos I a IV) y el complejo V (ATPasa) (**Figura 20D**). Curiosamente, el incremento de expresión de los genes que componen el GS “OXPHOS” constituye un buen indicador de la actividad biosintética de mTOR a través de la biogénesis mitocondrial (Cheng et al., 2016; Morita et al., 2013).



**Figura 19.** La microglía de los ratones modelos *APP<sub>751</sub>SL* y *MAPT<sub>p</sub>.P301S* muestran perfiles de transcripción globales similares que difieren de los de la microglía de ratones WT. Los gráficos de la izquierda representan los análisis de componentes principales mostrando la separación entre réplicas biológicas de microglía aislada de los ratones modelos *APP<sub>751</sub>SL* de 12 meses de edad, *MAPT<sub>p</sub>.P301S* de 9 meses de edad y WT de 12 meses de edad. Los gráficos de la derecha son gráficos de volcán representando las diferencias entre las distintas comparaciones estudiadas.



## RESULTADOS



**Figura 20. La transcripción de la HMS y la OXPHOS diferencia a la AßAM de la DAM.** Comparación de expresiones globales entre muestras de microglía CLEC7a+ aislada mediante FACS de los modelos murinos *APP*<sub>751SL</sub> de 12 meses de edad (estado patológico) y *MAPTp.P301S* de 9 meses de edad (estado patológico) y la microglía aislada de ratones WT de 12 meses de edad mediante GSEA. Los gráficos de la izquierda muestran enriquecimiento de diferentes GS y los paneles de la derecha muestran el *heat map* de los genes más enriquecidos en cada caso, simbolizando el rojo incremento de expresión y el azul disminución de expresión. **(A)** GSEA mostrando el enriquecimiento del GS "MGnD" en la comparación entre muestras de microglía aislada de ratones *APP*<sub>751SL</sub> versus WT (panel izquierdo) y muestras de microglía aislada de ratones *MAPTp.P301S* versus WT (panel derecho). **(B)** GSEA mostrando el enriquecimiento del GS "HMS" en la comparación entre muestras de microglía aislada de ratones *APP*<sub>751SL</sub> versus WT. **(C)** GSEA mostrando el enriquecimiento del GS "HMS" en la comparación entre muestras de microglía aislada de ratones *APP*<sub>751SL</sub> versus *MAPTp.P301S*. **(D)** GSEA mostrando el enriquecimiento del GS "OXPHOS" en la comparación entre muestras de microglía aislada de ratones *APP*<sub>751SL</sub> versus WT (panel izquierdo) y muestras de microglía aislada de ratones *MAPTp.P301S* versus WT (panel derecho).



RESULTADOS

GS	Size	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	Rank at max	Leading edge
MGnD	23	0.92	2.74	0.000	0.000	0.000	1142	tags=78%, list=5%, signal=82%
GO OXIDATIVE PHOSPHORYLATION	78	0.69	2.63	0.000	0.000	0.000	5319	tags=78%, list=24%, signal=103%
GO RESPONSE TO TYPE I INTERFERON	52	0.75	2.62	0.000	0.000	0.000	2346	tags=58%, list=11%, signal=64%
HMS	103	0.65	2.58	0.000	0.000	0.000	3053	tags=47%, list=14%, signal=54%
GO ESTABLISHMENT OF PROTEIN LOCALIZATION TO ENDOPLASMIC RETICULUM	82	0.64	2.50	0.000	0.000	0.000	5971	tags=74%, list=27%, signal=102%
GO ELECTRON TRANSPORT CHAIN	86	0.65	2.48	0.000	0.000	0.000	5319	tags=70%, list=24%, signal=92%
GO RESPONSE TO VIRUS	203	0.55	2.45	0.000	0.000	0.000	2673	tags=35%, list=12%, signal=40%
GO CELLULAR RESPIRATION	129	0.58	2.42	0.000	0.000	0.000	5319	tags=62%, list=24%, signal=81%
GO NEGATIVE REGULATION OF VIRAL GENOME REPLICATION	37	0.74	2.42	0.000	0.000	0.000	2225	tags=49%, list=10%, signal=54%
GO TRANSLATIONAL TERMINATION	89	0.62	2.41	0.000	0.000	0.000	3697	tags=49%, list=17%, signal=59%

Tabla 2. Los 10 GSs de la categoría "*Biological Processes*" que más incrementan su expresión en la microglía aislada de ratones *APP<sub>751</sub>SL* versus WT. Los 10 GSs que más incrementan su expresión en la microglía aislada mediante FACS de ratones de 12 meses de edad *APP<sub>751</sub>SL* versus WT revelado por GSEA.



## RESULTADOS

GS	Size	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	Rank at max	Leading edge
<b>MGnD</b>	23	0.92	2.81	0.000	0.000	0.000	397	tags=70%. list=2%. signal=71%
<b>GO OXIDATIVE PHOSPHORYLATION</b>	78	0.68	2.67	0.000	0.000	0.000	5091	tags=72%. list=23%. signal=93%
<b>GO RESPONSE TO VIRUS</b>	203	0.56	2.55	0.000	0.000	0.000	2819	tags=33%. list=13%. signal=38%
<b>GO ELECTRON TRANSPORT CHAIN</b>	86	0.64	2.55	0.000	0.000	0.000	5091	tags=64%. list=23%. signal=83%
<b>GO RESPONSE TO TYPE I INTERFERON</b>	52	0.70	2.49	0.000	0.000	0.000	2819	tags=54%. list=13%. signal=62%
<b>GO DEFENSE RESPONSE TO VIRUS</b>	128	0.58	2.46	0.000	0.000	0.000	2819	tags=38%. list=13%. signal=43%
<b>GO INNATE IMMUNE RESPONSE</b>	426	0.49	2.43	0.000	0.000	0.000	2873	tags=29%. list=13%. signal=33%
<b>GO RESPONSE TO INTERFERON GAMMA</b>	101	0.59	2.42	0.000	0.000	0.000	1926	tags=29%. list=9%. signal=31%
<b>GO REGULATION OF HUMORAL IMMUNE RESPONSE</b>	41	0.70	2.42	0.000	0.000	0.000	903	tags=24%. list=4%. signal=25%
<b>GO NEGATIVE REGULATION OF MULTI ORGANISM PROCESS</b>	130	0.55	2.37	0.000	0.000	0.000	2328	tags=32%. list=11%. signal=35%

Tabla 3. Los 10 GSs de la categoría "Biological Processes" que más incrementan su expresión en la microglía aislada de ratones *MAPT*<sup>P301S</sup> versus WT. Los 10 GSs que más incrementan su expresión en la microglía aislada mediante FACS de ratones de 9 meses de edad *MAPT*<sup>P301S</sup> versus a la aislada de ratones de 12 meses de edad WT revelado por GSEA.

GS	Size	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	Rank at max	Leading edge
<b>HMS</b>	103	0.61	2.49	0.000	0.000	0.000	4164	tags=56%. list=19%. signal=69%
<b>GO ALCOHOL BIOSYNTHETIC PROCESS</b>	101	0.57	2.34	0.000	0.000	0.000	2496	tags=37%. list=11%. signal=41%
<b>GO STEROL BIOSYNTHETIC PROCESS</b>	38	0.67	2.25	0.000	0.001	0.003	1603	tags=47%. list=7%. signal=51%

Tabla 4. Los 3 GSs de la categoría "Biological Processes" que más incrementan su expresión en la microglía aislada de ratones *APP*<sup>751SL</sup> versus *MAPT*<sup>P301S</sup>. Los 3 GSs que más incrementan su expresión en la microglía aislada mediante FACS de ratones de 12 meses de edad *APP*<sup>751SL</sup> versus a la aislada de ratones de 9 meses de edad *MAPT*<sup>P301S</sup> revelado por GSEA.





## RESULTADOS

Para investigar si las vías de OXPHOS y HIF1 también coexisten en otras DAM, se realizó el mismo análisis en otros modelos de neurodegeneración y envejecimiento donde la microglía total fue aislada usando los marcadores CD45 y CD11b (**Figura 17**) (Chiu et al., 2013; Hickman et al., 2013; Wang et al., 2015), obteniendo resultados similares. El GS “MGnD” estaba enriquecido en la microglía de los diferentes modelos (**Tablas 5, 6 y 7 y Figura 21A**), pero sin embargo, el GS “HMS” era una característica prominente de la AβAM (**Tabla 5 y Figura 21B**), mientras que el GS “OXPHOS” estaba enriquecido en los modelos neurodegenerativos (**Tablas 5 y 6 y Figura 21C**), pero por el contrario estaba reducida su expresión en los modelos murinos de envejecimiento (**Tabla 8 y Figura 21D**).

GS	Size	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	Rank at max	Leading edge
MGnD	25	0.91	2.62	0.000	0.000	0.000	670	tags=68%, list=3%, signal=70%
HMS	100	0.67	2.54	0.000	0.000	0.000	2040	tags=36%, list=9%, signal=39%
GO REGULATION OF VIRAL GENOME REPLICATION	58	0.72	2.42	0.000	0.000	0.000	1895	tags=38%, list=8%, signal=41%
GO POSITIVE REGULATION OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR PRODUCTION	24	0.81	2.37	0.000	0.000	0.000	362	tags=25%, list=2%, signal=25%
GO NEGATIVE REGULATION OF VIRAL GENOME REPLICATION	36	0.76	2.34	0.000	0.000	0.000	1895	tags=53%, list=8%, signal=57%
GO REGULATION OF PHOSPHOLIPID METABOLIC PROCESS	55	0.67	2.30	0.000	0.000	0.002	1483	tags=18%, list=6%, signal=19%
GO RESPONSE TO TYPE I INTERFERON	48	0.70	2.28	0.000	0.000	0.002	1446	tags=42%, list=6%, signal=44%
GO REGULATION OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR PRODUCTION	29	0.75	2.23	0.000	0.001	0.005	1376	tags=31%, list=6%, signal=33%
GO DEFENSE RESPONSE TO VIRUS	120	0.56	2.21	0.000	0.002	0.011	1895	tags=32%, list=8%, signal=34%
GO OXIDATIVE PHOSPHORYLATION	71	0.62	2.19	0.000	0.002	0.016	5364	tags=59%, list=23%, signal=77%

Tabla 5. Los 10 GSs de la categoría “*Biological Processes*” que más incrementan su expresión en la microglía aislada de ratones *5xfAD* versus WT. Los 10 GSs que más incrementan su expresión en la microglía aislada mediante FACS de ratones de 8,5 meses de edad *5xfAD* versus WT (Wang et al., 2015) revelado por GSEA.



## RESULTADOS

GS	Size	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	Rank at max	Leading edge
<b>MGnD</b>	24	0.78	2.03	0.000	0.000	0.000	8851	tags=88%, list=17%, signal=106%
<b>GO OXIDATIVE PHOSPHORYLATION</b>	78	0.64	1.86	0.000	0.012	0.022	17377	tags=95%, list=34%, signal=143%
<b>GO ESTABLISHMENT OF PROTEIN LOCALIZATION TO ENDOPLASMIC RETICULUM</b>	99	0.62	1.83	0.000	0.017	0.050	18252	tags=95%, list=35%, signal=146%
<b>GO CELLULAR RESPIRATION</b>	134	0.60	1.81	0.000	0.026	0.100	17377	tags=85%, list=34%, signal=128%
<b>GO REGULATION OF SISTER CHROMATID SEGREGATION</b>	61	0.62	1.80	0.000	0.024	0.114	15986	tags=87%, list=31%, signal=126%
<b>GO ELECTRON TRANSPORT CHAIN</b>	89	0.61	1.80	0.000	0.021	0.117	17377	tags=88%, list=34%, signal=132%
<b>GO PROTEIN LOCALIZATION TO CYTOSKELETON</b>	27	0.67	1.79	0.000	0.018	0.118	15099	tags=85%, list=29%, signal=120%
<b>GO PROTEIN DEGLYCOSYLATION</b>	20	0.69	1.78	0.000	0.019	0.138	14069	tags=95%, list=27%, signal=130%
<b>GO REGULATION OF CHROMOSOME SEGREGATION</b>	78	0.61	1.78	0.000	0.017	0.144	15986	tags=85%, list=31%, signal=122%
<b>GO GOLGI TO PLASMA MEMBRANE TRANSPORT</b>	39	0.64	1.78	0.000	0.017	0.157	15174	tags=85%, list=29%, signal=120%

Tabla 6. Los 10 GSs de la categoría “*Biological Processes*” que más incrementan su expresión en la microglía aislada de ratones *SOD1p.G93A versus WT*. Los 10 GSs que más incrementan su expresión en la microglía aislada mediante FACS de ratones *SOD1p.G93A* de 130 días de edad *versus WT* (Chiu et al., 2013) revelado por GSEA.





RESULTADOS

GS	Size	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	Rank at max	Leading edge
<b>MGnD</b>	24	0.83	1.75	0.020	1	0.826	2954	tags=71%, list=6%, signal=75%
<b>GO KERATINIZATION</b>	42	0.64	1.54	0.000	1	0.988	3799	tags=40%, list=7%, signal=44%
<b>GO BONE GROWTH</b>	20	0.70	1.41	0.103	1	0.999	3778	tags=60%, list=7%, signal=65%
<b>GO PEPTIDE CROSS LINKING</b>	46	0.56	1.39	0.000	1	0.999	3106	tags=37%, list=6%, signal=39%
<b>GO REGULATION OF RENAL SODIUM EXCRETION</b>	22	0.60	1.34	0.051	1	0.999	2880	tags=27%, list=6%, signal=29%
<b>GO REGULATION OF ENDOTHELIAL CELL CHEMOTAXIS</b>	17	0.70	1.33	0.128	1	0.999	2135	tags=35%, list=4%, signal=37%
<b>GO PROSTATE GLAND MORPHOGENESIS</b>	22	0.63	1.31	0.088	1	1	4436	tags=32%, list=9%, signal=35%
<b>GO CHRONIC INFLAMMATORY RESPONSE</b>	15	0.66	1.28	0.147	1	1	2658	tags=53%, list=5%, signal=56%
<b>GO INTERMEDIATE FILAMENT ORGANIZATION</b>	20	0.60	1.25	0.128	1	1	1844	tags=45%, list=4%, signal=47%
<b>GO MULTICELLULAR ORGANISMAL MACROMOLECULE METABOLIC PROCESS</b>	70	0.45	1.24	0.000	1	1	2363	tags=34%, list=5%, signal=36%

Tabla 7. Los 10 GSs de la categoría “*Biological Processes*” que más incrementan su expresión en la microglía aislada de ratones WT envejecidos. Los 10 GSs que más incrementan su expresión en la microglía aislada mediante FACS de ratones WT de 24 meses de edad *versus* a la de ratones WT de 5 meses de edad (Hickman et al., 2013) revelado por GSEA.



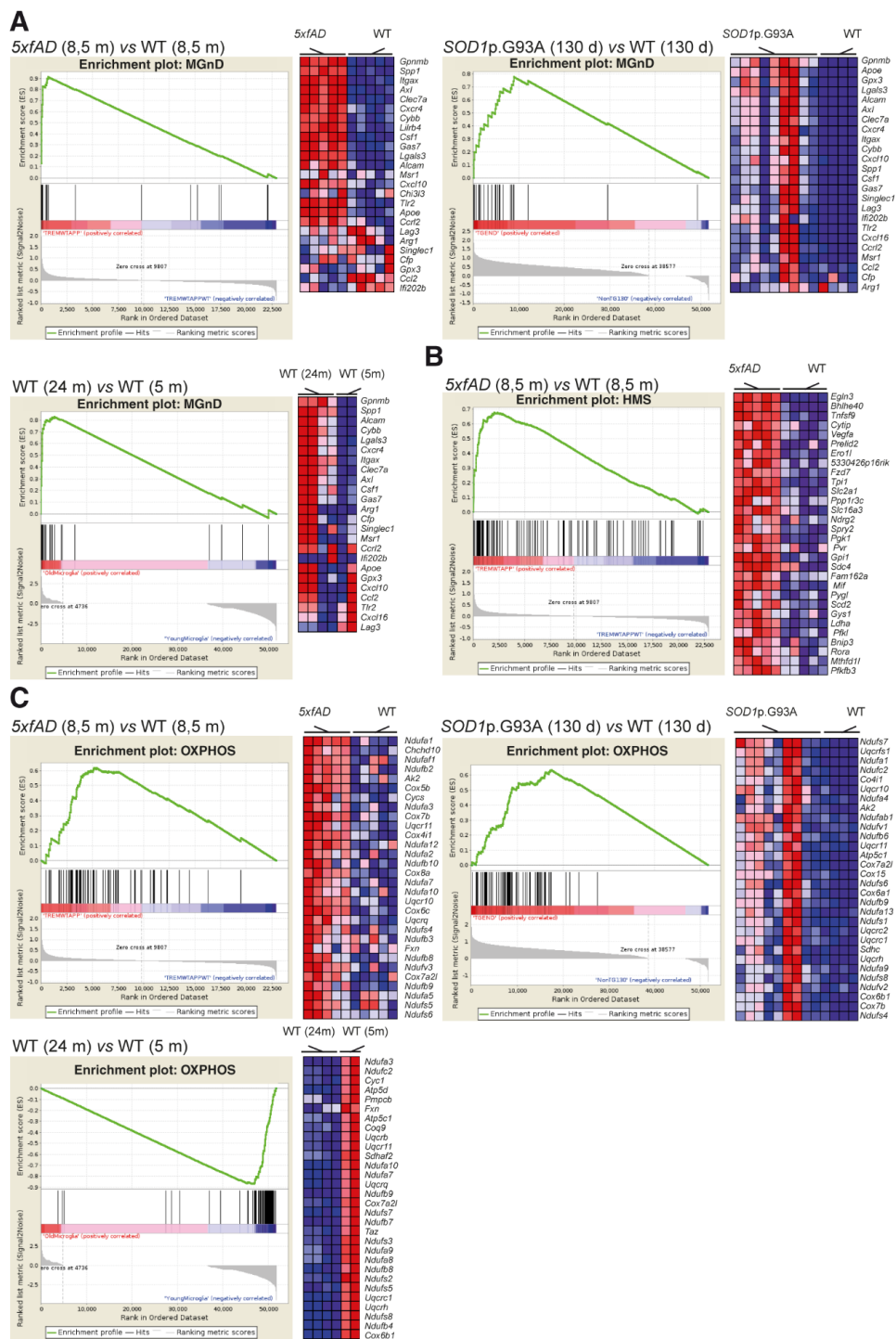
## RESULTADOS

GS	Size	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	Rank at max	Leading edge
GO OXIDATIVE PHOSPHORYLATION	78	-0.87	-1.48	0.000	0.221	0.349	5136	tags=85%, list=10%, signal=94%
GO MITOCHONDRIAL RESPIRATORY CHAIN COMPLEX ASSEMBLY	62	-0.87	-1.44	0.000	0.318	0.609	4668	tags=85%, list=9%, signal=94%
GO TRANSLATIONAL ELONGATION	106	-0.84	-1.43	0.000	0.303	0.702	5159	tags=82%, list=10%, signal=91%
GO TRANSLATIONAL TERMINATION	90	-0.85	-1.43	0.000	0.246	0.707	4699	tags=82%, list=9%, signal=90%
GO ESTABLISHMENT OF PROTEIN LOCALIZATION TO ENDOPLASMIC RETICULUM	99	-0.84	-1.43	0.000	0.215	0.722	7329	tags=91%, list=14%, signal=106%
GO PROTEIN LOCALIZATION TO ENDOPLASMIC RETICULUM	118	-0.84	-1.43	0.000	0.191	0.730	7329	tags=89%, list=14%, signal=103%
GO MITOCHONDRIAL RESPIRATORY CHAIN COMPLEX I BIOGENESIS	50	-0.86	-1.42	0.000	0.212	0.818	4668	tags=86%, list=9%, signal=94%
GO MITOCHONDRIAL TRANSLATION	103	-0.83	-1.41	0.000	0.231	0.873	8086	tags=91%, list=16%, signal=108%
GO ELECTRON TRANSPORT CHAIN	89	-0.83	-1.41	0.000	0.216	0.882	5429	tags=76%, list=10%, signal=85%
GO RIBOSOME ASSEMBLY	49	-0.85	-1.41	0.000	0.204	0.899	5551	tags=82%, list=11%, signal=91%

Tabla 8. Los 10 GSs de la categoría “*Biological Processes*” que más disminuyen su expresión en la microglía aislada en ratones WT envejecidos. Los 10 GSs que más disminuyen su expresión en la microglía aislada mediante FACS de ratones de 24 meses de edad WT *versus* a la de ratones de 5 meses de edad (Hickman et al., 2013) revelado por GSEA.



## RESULTADOS



**Figura 21. Expresión de los GSs “MGnD”, “HMS” y “OXPHOS” en la microglía de diferentes modelos murinos de neurodegeneración y envejecimiento.** Comparación de expresiones globales entre muestras de microglía CD11b+/CD45+ aislada mediante FACS de los modelos murinos 5xfAD de 8,5 meses de edad *versus* WT de 8,5 meses de edad (Wang et al., 2015), SOD1p.G93A de 130 días *versus* WT de 130 días (Chiu et al., 2013)





## RESULTADOS

expresión en cada caso. **(A)** GSEA mostrando el enriquecimiento del GS “KEGG Glycolysis Gluconeogenesis”. **(B)** GSEA mostrando el empobrecimiento del GS “KEGG Oxidative Phosphorylation”.

GS	Tamaño	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	Rank at max	Leading edge
KEGG GLYCOLYSIS GLUCONEOGENESIS	54	0.71	2.41	0.000	0.000	0.000	723	tags=30%, list=5%, signal=31%
KEGG GALACTOSE METABOLISM	25	0.80	2.34	0.000	0.000	0.000	606	tags=32%, list=5%, signal=33%
KEGG ECM RECEPTOR INTERACTION	81	0.61	2.24	0.000	0.000	0.000	2564	tags=51%, list=19%, signal=62%
KEGG FRUCTOSE AND MANNOSE METABOLISM	32	0.72	2.23	0.000	0.000	0.000	707	tags=31%, list=5%, signal=33%
KEGG STARCH AND SUCROSE METABOLISM	30	0.73	2.23	0.000	0.000	0.000	267	tags=23%, list=2%, signal=24%
KEGG GLYOXYLATE AND DICARBOXYLATE METABOLISM	16	0.76	2.00	0.000	0.001	0.009	511	tags=25%, list=4%, signal=26%
KEGG PENTOSE PHOSPHATE PATHWAY	24	0.67	1.94	0.000	0.004	0.033	707	tags=29%, list=5%, signal=31%
KEGG FOCAL ADHESION	186	0.47	1.94	0.000	0.004	0.033	2850	tags=37%, list=22%, signal=47%
KEGG RENAL CELL CARCINOMA	67	0.54	1.92	0.000	0.005	0.046	2284	tags=28%, list=17%, signal=34%
KEGG NEUROACTIVE LIGAND RECEPTOR INTERACTION	239	0.44	1.84	0.000	0.013	0.131	4769	tags=58%, list=36%, signal=89%

Tabla 9. Los 10 GSs de la categoría “KEGG Pathway” que más incrementan su expresión en los cultivos primarios de microglía expuestos a condiciones de hipoxia versus normoxia. Los 10 GSs que más incrementan su expresión en muestras de cultivos primarios de microglía expuestos a condiciones de hipoxia (1% O<sub>2</sub>, 6 h) versus normoxia (21% O<sub>2</sub>, 6 h) revelado por GSEA.



## RESULTADOS

GS	Tamaño	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	Rank at max	Leading edge
KEGG RIBOSOME	82	-0.68	-2.94	0.000	0.000	0.000	3735	tags=79%, list=28%, signal=110%
KEGG SPLICEOSOME	92	-0.57	-2.59	0.000	0.000	0.000	2710	tags=52%, list=21%, signal=65%
KEGG PROTEASOME	43	-0.67	-2.56	0.000	0.000	0.000	3001	tags=65%, list=23%, signal=84%
KEGG DNA REPLICATION	33	-0.70	-2.49	0.000	0.000	0.000	1788	tags=52%, list=14%, signal=59%
KEGG OXIDATIVE PHOSPHORYLATION	109	-0.51	-2.41	0.000	0.000	0.000	3350	tags=61%, list=25%, signal=81%
KEGG PARKINSONS DISEASE	104	-0.49	-2.25	0.000	0.000	0.001	3265	tags=56%, list=25%, signal=74%
KEGG MISMATCH REPAIR	22	-0.67	-2.20	0.000	0.001	0.007	3513	tags=73%, list=27%, signal=99%
KEGG NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR	43	-0.59	-2.18	0.000	0.001	0.009	3607	tags=63%, list=27%, signal=86%
KEGG PROTEIN EXPORT	19	-0.63	-2.03	0.006	0.005	0.033	3842	tags=74%, list=29%, signal=104%
KEGG HOMOLOGOUS RECOMBINATION	25	-0.59	-1.97	0.000	0.006	0.048	1788	tags=40%, list=14%, signal=46%

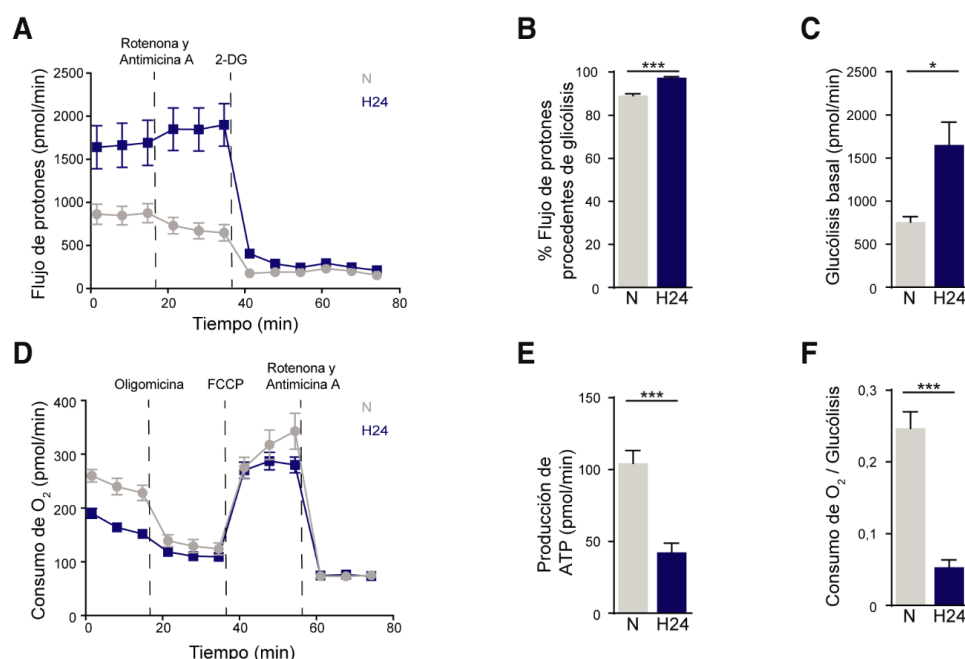
Tabla 10. Los 10 GSs de la categoría "KEGG Pathway" que más disminuyen su expresión en los cultivos primarios de microglía expuestos a condiciones de hipoxia versus normoxia. Los 10 GSs que más disminuyen su expresión en muestras de cultivos primarios de microglía expuestos a condiciones de hipoxia (1% O<sub>2</sub>, 6 h) versus normoxia (21% O<sub>2</sub>, 6 h) revelado por GSEA.

Para confirmar estas observaciones se realizaron ensayos glucolíticos y de estrés mitocondrial mediante *Seahorse* en muestras de cultivos primarios de microglía expuestos a condiciones de normoxia (21% O<sub>2</sub>) o hipoxia (1% O<sub>2</sub>) durante 24 horas. En correspondencia con lo anteriormente observado, el ensayo glucolítico mostró que la cantidad de protones liberados al medio extracelular era mayor en las muestras de microglía expuestas a condiciones de hipoxia (**Figura 23A**). La mayoría de estos protones procedían de la glucólisis anaerobia, tanto en condiciones de hipoxia como en condiciones de normoxia, pues no se observaron apenas cambios al inhibir los complejos I y III de la cadena de transporte de electrones mediante el tratamiento con rotenona y antimicina A respectivamente (**Figura 23A-B**). Esto se traduce en que el mayor flujo de protones observado bajo condiciones de hipoxia se corresponde con una mayor tasa de glucólisis anaerobia basal en estas condiciones (**Figura 23C**). El consumo de O<sub>2</sub> mitocondrial de la microglía expuesta a hipoxia fue menor (**Figura 23D**), así como también fue menor producción de ATP procedente de la OXPHOS (**Figura 23E**), que se puede medir al inhibir el complejo V de la cadena de transporte



## RESULTADOS

de electrones mediante el tratamiento con oligomicina. Como consecuencia, la hipoxia *in cellulo* indujo una fuerte disminución en el cociente entre el consumo de O<sub>2</sub> mitocondrial y el flujo de protones procedentes de la glucólisis anaerobia en las células microgliales (**Figura 23F**). Esto demuestra que *in cellulo* las células microgliales tienen una respuesta clásica a la hipoxia.



**Figura 23. Ensayos de Seahorse revelan que en cultivos primarios de microglía la glucólisis aumenta y la OXPHOS disminuye por hipoxia. (A-F)** Cultivos primarios de microglía expuestos a condiciones de normoxia (N; 21% O<sub>2</sub>; 24 h; gris) o hipoxia (H24; 1% O<sub>2</sub>; 24 h; azul oscuro) en los que se midieron diferentes parámetros usando Seahorse. **(A)** Medida del flujo de protones al exterior celular. Las líneas discontinuas señalan en qué momento se inyectaron los reactivos indicados (2-DG; 2-deoxiglucosa). Se representa la media ± error estándar de la media en cada punto de medida (n = 5-6). **(B)** Porcentaje del flujo de protones que proceden exclusivamente de glucólisis. Se representa la media ± error estándar de la media (n = 5-6; \*\*\* p < 0,001; prueba t de Student). **(C)** Medida de la glucólisis basal. Se representa la media ± error estándar de la media (n = 5-6; \* p < 0,05; prueba t de Student). **(D)** Medida del consumo de O<sub>2</sub> mitocondrial. Las líneas discontinuas señalan en qué momento se inyectaron los reactivos indicados (FCCP; carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona). Se representa la media ± error estándar de la media en cada punto de medida (n = 4-6). **(E)** Medida de la producción de ATP. Se representa la media ± error estándar de la media (n = 4-6; \*\*\* p < 0,001; prueba t de Student). **(F)** Ratio del consumo de O<sub>2</sub> basal mitocondrial y el flujo de protones procedentes de la glucólisis basal. Se representa la media ± error estándar de la media (n = 4-6; \*\*\* p < 0,001; prueba t de Student).

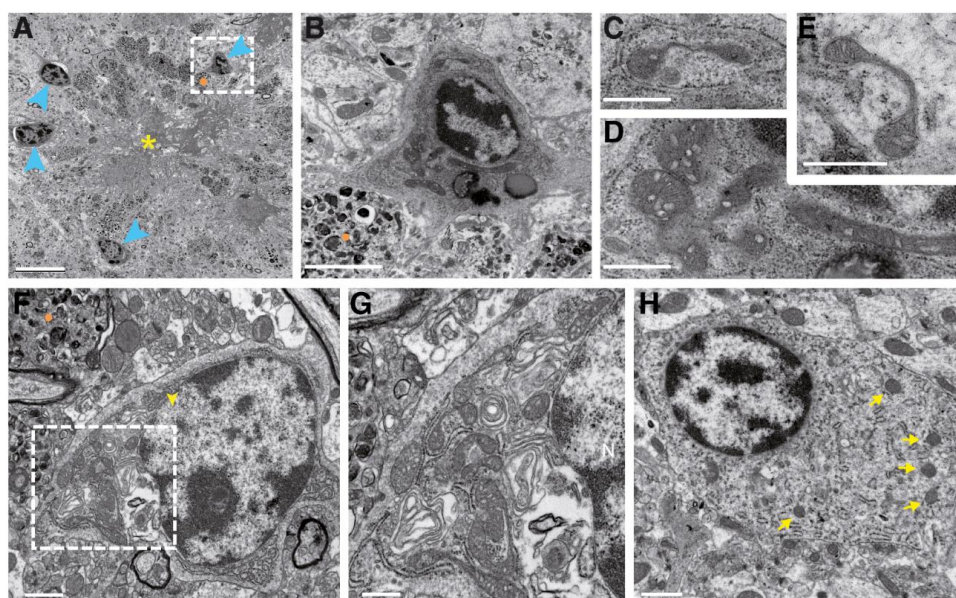
Tras esto se verificó si la biogénesis mitocondrial predicha por el enriquecimiento del GS “OXPHOS” estaba teniendo lugar en la AβAM (**Figuras 20D y 21C**). Para ello se examinaron mediante microscopia electrónica, en colaboración con el grupo de la Dra. Antonia Gutiérrez de la Universidad de Málaga, imágenes de células microgliales situadas cerca y lejos de placas de Aβ en muestras de corteza del modelo de deposición de Aβ *APP-PSEN1* de 6 y 12 meses de edad. Interesantemente, la AβAM mostró un mayor contenido mitocondrial que estaba acompañado por una expansión del retículo endoplásmico rugoso en estrecha asociación con las mitocondrias





## RESULTADOS

(Figura 24A-H). Estas características sugieren una actividad biosintética dependiente de la mitocondria en la AβAM, que podría estar mediada por la vía mTOR (Morita et al., 2015). Una inspección más detallada reveló que las mitocondrias de la AβAM presentaban formas elongadas (Figura 24B-G) en comparación con las mitocondrias con forma redondeada típica observadas en la microglía situada lejos de los depósitos de Aβ (Figura 24H), incluyendo formas anormales en forma de boomerang (Figura 24B-G). La elongación mitocondrial ha sido descrita en células no transformadas y células tumorales expuestas a bajos niveles de O<sub>2</sub> y estrés nutricional, lo que induce un estado metabólico caracterizado por un cambio de glucólisis anaerobia a OXPHOS (Gomes et al., 2011; Rambold et al., 2011).



**Figura 24. En la AβAM la mitocondria se elonga y el retículo endoplásmico se expande. (A-H)** Imágenes de microscopía electrónica de secciones corticales del cerebro de ratones *APP-PSEN1* de 6 meses de edad (A-E, H) y 12 meses de edad (F-G). La microglía puede reconocerse por su oscuro citoplasma y las mitocondrias por su morfología. El retículo endoplásmico rugoso es identificable por la presencia de ribosomas (puntos negros en estructura lineal, ver por ejemplo paneles C y G). (A-G) La AβAM (puntas de flechas azules en A) se encuentra alrededor de las placas amiloides (asterisco amarillo). Algunas neuritas distróficas representativas, que indican cercanía a las placas de Aβ, están marcadas con puntos naranjas (A, B y F). Los paneles B-D son aumentos del recuadro blanco mostrado en A y el panel G es un aumento del recuadro blanco mostrado en F. (E) Este panel es de una AβAM independiente. (H) Se representa una microglía homeostática encontrada lejos de las placas de Aβ. Tiene un contenido reducido de mitocondrias y retículo endoplásmico y la morfología de las mitocondrias es redondeada (flechas amarillas). Las barras de escala son de 10 μm en A, de 2 μm en B, de 0,5 μm en C-E y G y de 1 μm en F y H.

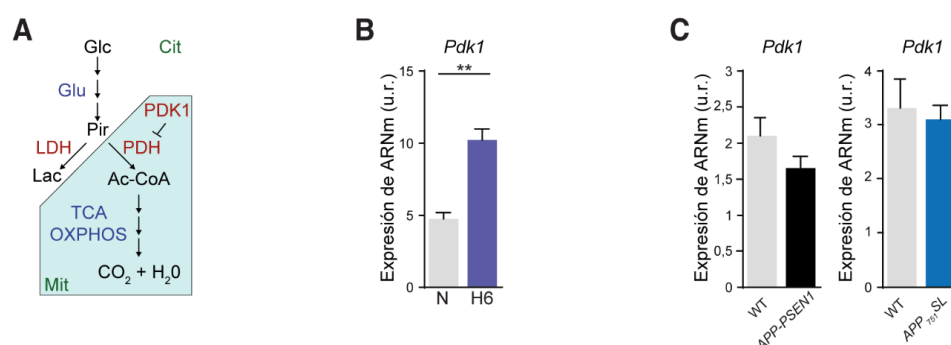
Pero, ¿cómo puede la OXPHOS activarse en células con una elevada actividad de HIF1? La glucólisis aerobia –transformación de glucosa a dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y agua (H<sub>2</sub>O) incluyendo la respiración de O<sub>2</sub> en la mitocondria– puede activarse al atenuarse la inducción mediada por HIF1 de la piruvato deshidrogenasa quinasa 1 (PDK1) (Li et al., 2017). PDK1 deriva el piruvato





## RESULTADOS

fuera de las mitocondrias, al evitar la conversión en este orgánulo del piruvato en acetil-coenzima A (**Figura 25A**) (Kim et al., 2006; Papandreou et al., 2006). Por lo tanto, se exploró si las células microgliales inducen la expresión de PDK1 por hipoxia *in cellulo* o por la activación de la vía de HIF1 en la AβAM. Se observó que la expresión del ARNm de *Pdk1* medida por qRT-PCR en muestras de cultivos primarios de microglía expuestos a condiciones de normoxia (21% O<sub>2</sub>) o de hipoxia (1% O<sub>2</sub>) durante 6 horas, estaba inducida en condiciones de hipoxia (**Figura 25B**), pero no en la AβAM de dos modelos diferentes de deposición de Aβ (**Figura 25C**), a pesar de la actividad transcripcional de HIF1 observada en la microglía de diferentes modelos murinos de deposición de Aβ (**Figuras 20B, 20C y 21B**). Todos estos datos sugieren que la AβAM redirige la glucosa, al menos parcialmente, hacia la mitocondria para mantener activa la OXPHOS, incluso en presencia de hipoxia e hipoperfusión.



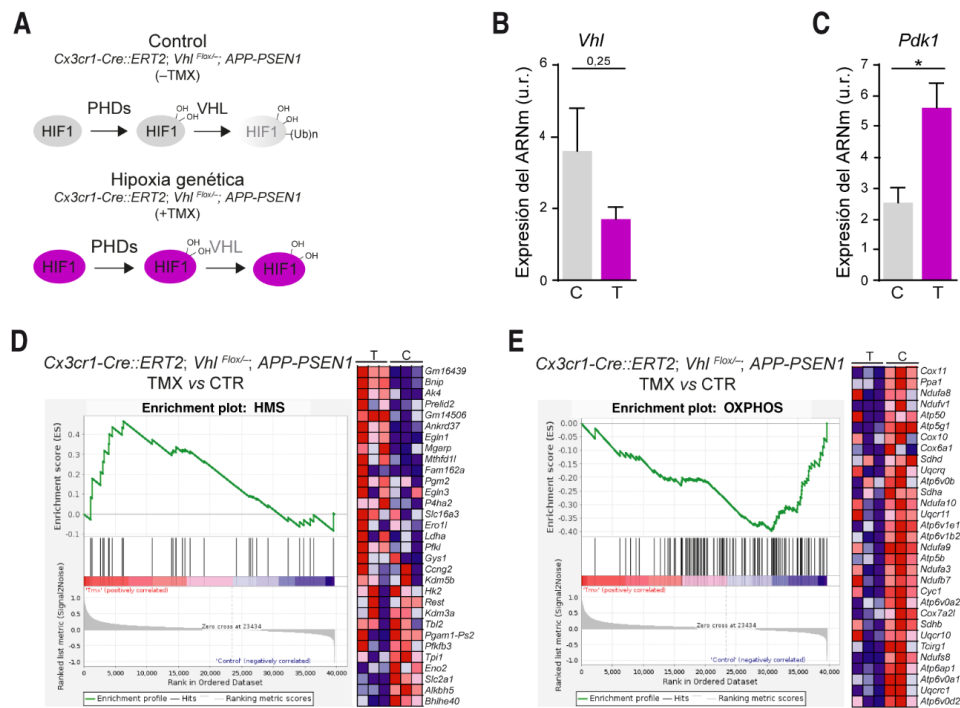
**Figura 25. La expresión de *Pdk1* está incrementada en los cultivos de microglía expuestos a condiciones de hipoxia, pero no en la AβAM de diferentes modelos de EA. (A)** Representación esquemática de la glucólisis aerobia (glucosa a CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O) y anaerobia (glucosa a lactato). El texto en negro son metabolitos, en azul vías, en rojo enzimas y en verde compartimentos subcelulares. Glc: glucosa; Pir: piruvato; Lac: lactato; Ac-CoA: acetil-coenzima A; Glu: glucólisis; TCA: ciclo del ácido tricarboxílico; OXPHOS: fosforilación oxidativa; LDH: lactato deshidrogenasa; PHD: piruvato deshidrogenasa; PDK1: piruvato deshidrogenasa quinasa 1; Cit: citoplasma; Mit: mitocondria. **(B)** qRT-PCR del gen *Pdk1* en muestras de cultivos de microglía expuestos a condiciones de normoxia (N; 21% O<sub>2</sub>; barra gris) o hipoxia (H6; 1% O<sub>2</sub>; barra azul) durante 6 horas. Se usó *Hmbs* como gen control. Se representa la media ± error estándar de la media (u.r. unidades relativas). (n = 3; \*\*p < 0,01; prueba t de Student). **(C)** qRT-PCR del gen *Pdk1* en muestras de microglía aisladas mediante FACS de ratones de 12 meses de edad WT (barra gris), *APP-PSEN1* (gráfico izquierdo; barra negra) y *APP751SL* (gráfico derecho; barra azul). Se usó *Hmbs* como gen control. Se representa la media ± error estándar de la media (u.r. unidades relativas). (n = 3-5; prueba t de Student).

En normoxia, los genes *Hif* se transcriben y traducen constitutivamente, pero la proteína resultante es degradada por el proteasoma a través de la hidroxilación dependiente de O<sub>2</sub> por las PHDs y la ubiquitinación mediada por VHL (Kaelin & Ratcliffe, 2008). Como la sobre-estabilización de HIF1 por la deficiencia de *Vhl* induce la glucólisis anaerobia y la inhibición de la actividad mitocondrial (Kim et al., 2006; Papandreou et al., 2006; Zhang et al., 2007), se creó un nuevo modelo de deposición de Aβ con eliminación condicional del gen *Vhl* en la microglía adulta mediante el tratamiento con TMX durante 30 días (*Cx3cr1-Cre::ERT2; Vhl<sup>Fllox/-</sup>; APP-PSEN1*)



RESULTADOS

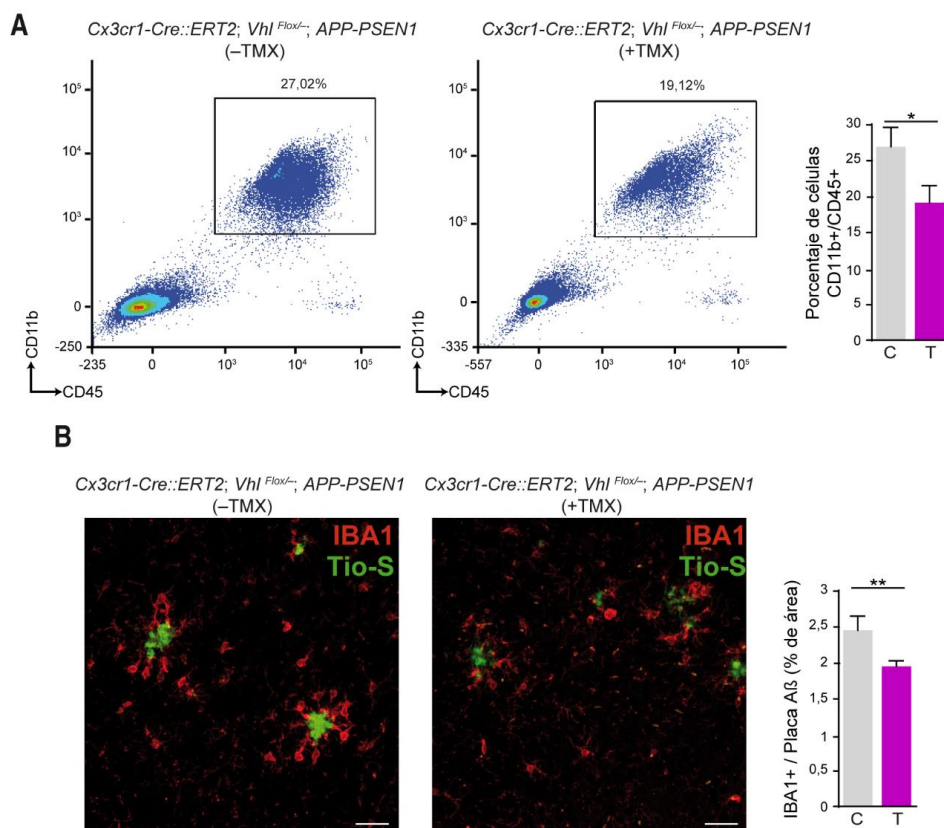
(Figura 26A). En la microglía CD11b+/CD45+ aislada de este modelo murino de 12 meses de edad tratado y sin tratar con TMX durante los 30 días previos a su sacrificio, se midió mediante qRT-PCR la expresión del ARNm del gen *Vhl* (Figura 26B), así como del gen *Pdk1* (Figura 26C) observándose que el tratamiento con TMX disminuye la expresión de *Vhl* e induce la expresión de *Pdk1*. Todo esto se vio acompañado con una sobre-inducción del GS “HMS” (Figura 26D) y con la reducción de la OXPHOS (Figura 26E). Además, el tratamiento con TMX produjo una disminución del porcentaje de células microgliales CD11b+/CD45+ (Figura 27A), que se confirmó por una disminución de la inmunoreactividad de IBA1 alrededor de las placas de Aβ (Figura 27B).



**Figura 26. La eliminación de *Vhl* en el modelo de EA *APP-PSEN1* incrementa la expresión de la HMS y reduce la OXPHOS.** (A) Representación esquemática de los modelos murinos usados para generar hipoxia genética (sobre-estabilización de HIF por eliminación de *Vhl*) en la microglía adulta. (B) qRT-PCR del gen *Vhl* en muestras de microglía CD11b+/CD45+ aisladas mediante FACS de ratones de 12 meses de edad *Cx3cr1-Cre::ERT2; Vhl<sup>Flox/-</sup>* tratados con vehículo (C; barra gris) o con TMX durante 30 días (T; barra magenta). Se usó *Hmb* como gen control. Se representa la media  $\pm$  error estándar de la media (u.r. unidades relativas). ( $n = 3-5$ ; prueba *t* de Student). (C) qRT-PCR del gen *Pdk1* en muestras de microglía CD11b+/CD45+ aisladas mediante FACS de ratones de 12 meses de edad *Cx3cr1-Cre::ERT2; Vhl<sup>Flox/-</sup>* tratados con vehículo (C; barra gris) o con TMX durante 30 días (T; barra magenta). Se usó *Hmb* como gen control. Se representa la media  $\pm$  error estándar de la media (u.r. unidades relativas). ( $n = 3-5$ ; \*  $p < 0,05$ ; prueba *t* de Student). (D-E) Comparación de expresiones globales entre muestras de microglía CD11b+/CD45+ aislada mediante FACS de ratones de 12 meses de edad *Cx3cr1-Cre::ERT2; Vhl<sup>Flox/-</sup>; APP-PSEN1* tratados con TMX versus *Cx3cr1-Cre::ERT2; Vhl<sup>Flox/-</sup>; APP-PSEN1* no tratados mediante GSEA. Los gráficos de la izquierda muestran enriquecimiento o empobrecimiento de diferentes GS y los paneles de la derecha muestran el *heat map* de los genes que muestran más cambio en cada caso, simbolizando el rojo incremento de expresión y el azul disminución de expresión. (D) GSEA mostrando el enriquecimiento del GS “HMS”. (E) GSEA mostrando empobrecimiento del GS “OXPHOS”.



## RESULTADOS



**Figura 27. La eliminación de *Vhl* en el modelo de la EA *APP-PSEN1* induce disfunción microglial.** (A) Los paneles izquierdos son gráficos representativos de densidad de citometría de flujo de muestras de microglía CD11b+/CD45+ aislada *ex vivo* de ratones *Cx3cr1-Cre: ERT2; Vhl<sup>Flox/-</sup>; APP-PSEN1* tratados con vehículo o con TMX durante 30 días. La microglía se incluye en los recuadros representados y se caracteriza por la expresión superficial de CD45 y CD11b. Se muestran los porcentajes representativos de las subpoblaciones microgliales según los niveles de expresión de la proteína CD45. El gráfico de la derecha representa la cuantificación del porcentaje de células CD11b+/CD45+ en los ratones *Cx3cr1-Cre: ERT2; Vhl<sup>Flox/-</sup>; APP-PSEN1* tratados con vehículo (C; barra gris) o con TMX durante 30 días (T; barra magenta). Se representa la media ± error estándar de la media ( $n = 5$ ; \*  $p < 0,05$ ; prueba *t* de Student). (B) Los paneles de la izquierda representan secciones corticales de los ratones *Cx3cr1-Cre:ERT2; Vhl<sup>Flox/-</sup>; APP-PSEN1* tratados con vehículo o con TMX durante 30 días y teñidas con el marcador microglial IBA1 (rojo) y el marcador de placas de Aβ Tio-S (verde). Las barras de escala son de 20 μm. El gráfico de la derecha representa la cuantificación del porcentaje de área de placa de Aβ ocupado por microglía IBA1+ en ratones *Cx3cr1-Cre: ERT2; Vhl<sup>Flox/-</sup>; APP-PSEN1* tratados con vehículo (C; barra gris) o con TMX durante 30 días (T; barra magenta). Se representa la media ± error estándar de la media ( $n = 39-44$  placas; 3 ratones por grupo; \*\*  $p < 0,01$ ; prueba *t* de Student).

Estos resultados indican que la AβAM requiere una actividad acoplada entre la glucólisis y la OXPHOS para mantener sus respuestas defensivas y de supervivencia en su entorno hipóxico e hipoperfundido.



RESULTADOS

### 3.2. OBJETIVO 2: PHD3 EN LA MICROGLÍA DE LA EA

#### 3.2.1. *Egln3* se expresa en la A $\beta$ AM

Mediante experimentos de secuenciación de ARN de célula única realizados en áreas de corteza somatosensorial e hipocampo CA1 de ratón, se ha mostrado que no hay expresión destacada del ARNm de *Egln3* en la microglía homeostática y que solo hay niveles moderados de expresión de este gen en ciertos tipos de interneuronas (Zeisel et al., 2015). Sin embargo, estudios de microarray realizados en microglía aislada mediante FACS del modelo murino de la EA que deposita A $\beta$ , *APP-PSEN1*, han mostrado que *Egln3* es uno de los genes que más incrementada tiene su expresión (Orre et al., 2014a).

Para confirmar la expresión de *Egln3* en la microglía de ratones *APP-PSEN1*, se realizaron experimentos de ISH para este gen combinados con inmunofluorescencia para el marcador de microglía IBA1. Aunque los niveles de expresión de *Egln3* en microglía fueron bajos, su expresión se encontró casi exclusivamente restringida a la microglía situada cerca de las placas amiloides (**Figura 28A**), mientras que en la microglía situada lejos de placa no se encontró expresión de *Egln3* (**Figura 28B**), similar a lo observado previamente con *Hif1a* (**Figura 11**).

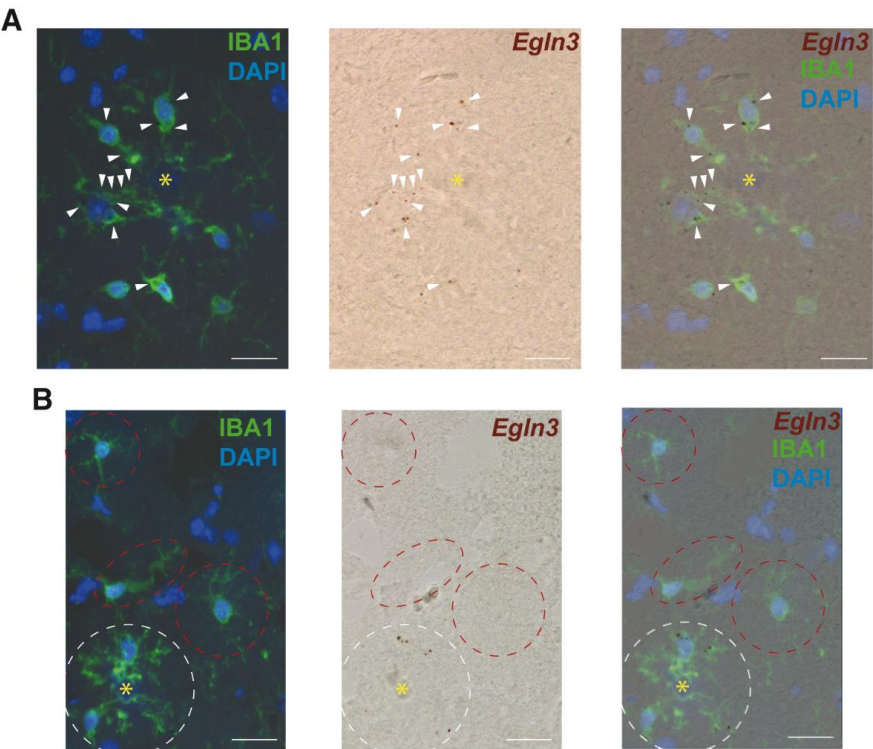


Figura 28. La expresión del ARNm de *Egln3* en microglía se restringe a la zona cercana a depósitos



**amiloides.** Secciones coronales representativas de ratones *APP-PSEN1* de 8 meses de edad tras ISH con sonda *Egln3* (marrón), inmunotinción con anticuerpo anti-IBA1 (verde) y tinción nuclear con DAPI (azul). Los paneles de la izquierda muestran los marcadores fluorescentes IBA1 y DAPI, los paneles centrales muestran la sonda *Egln3* en campo claro y los paneles de la derecha muestran la colocalización de los paneles izquierdo y central. Los asteriscos indican la posición de las placas amiloides. Las barras de escala son de 20  $\mu$ m. **(A)** Microglía rodeando una placa amiloide. Las puntas de flechas blancas indican células microgliales cercanas a placa con una fuerte expresión de *Egln3*. **(B)** Imagen de bajo aumento de la microglía que rodea a la placa y que se sitúa lejos de ella. El círculo discontinuo blanco contiene la microglía situada cerca de placa amiloide y los círculos discontinuos rojos la microglía situada lejos de depósitos amiloides.

Estos datos pertenecientes a mi proyecto de tesis doctoral fueron también incluidos en la tesis de Manuel Alejandro Sánchez García (Sánchez-García, 2018), como apoyo a sus datos experimentales.

### 3.2.2. La eliminación de *Egln3* en el modelo de EA *APP-PSEN1* no incrementa la HMS

Para estudiar el papel de PHD3, proteína codificada por el gen *Egln3*, en la microglía del modelo murino *APP-PSEN1*, se realizó un experimento de pérdida de función genética. Para ello se cruzaron ratones *APP-PSEN1* con un ratón *knock-out* para *Egln3*, el cual tiene una viabilidad normal y solo muestra un fenotipo muy leve con alteraciones menores en el desarrollo del linaje simpático-adrenal (Bishop et al., 2008). Como resultado se obtuvo el ratón *Egln3*<sup>-/-</sup>; *APP-PSEN1*.

Estudios previos realizados en el laboratorio con estos animales, y descritos previamente en la introducción, mostraron que la deficiencia de PHD3 mejoró la función de barrera de la microglía, aumentó el número de microglía alrededor de las placas amiloides, potenció la fagocitosis y el aclaramiento de A $\beta$ , disminuyó la neurodegeneración asociada a las placas y restauró los déficits de comportamiento observados en ratones *APP-PSEN1* (Sánchez-García, 2018).

Para explorar cuáles son los mecanismos implicados en los cambios observados en la microglía de los ratones *Egln3*<sup>-/-</sup>; *APP-PSEN1* con respecto a la microglía de los ratones *APP-PSEN1*, se aisló mediante FACS la microglía CD11b<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup> positiva de ratones de 12 meses de edad, y se llevaron a cabo experimentos de microarray y GSEA. Los datos obtenidos fueron también incluidos en la tesis de Manuel Alejandro Sánchez García (Sánchez-García, 2018), como datos de un proyecto llevado a cabo en colaboración por ambos. Con el análisis de microarray se clasificaron aquellos genes DE en la microglía de los ratones *Egln3*<sup>-/-</sup>; *APP-PSEN1* con respecto a la microglía de los ratones *APP-PSEN1*, de acuerdo con el siguiente criterio: los cambios transcripcionales se consideraron estadísticamente significativos cuando  $|\log FC| > 0,5$  y  $p < 0,05$  (**Tabla suplementaria 8**).

Uno de los cambios esperables por la eliminación de *Egln3* podría ser el aumento de expresión de HIF1 $\alpha$ , y como consecuencia la activación de sus genes dianas, ya que está descrito que PHD3 provoca la desestabilización de HIF1 $\alpha$  *in vitro* mediante un bucle de retroalimentación negativo





## RESULTADOS

(Ginouvé et al., 2008). Para estudiar esta posibilidad, en las muestras de microglía aislada mediante FACS se realizó un GSEA usando la categoría “*Biological Processes*” la cual incluye un GS de “*Response to Hypoxia*”, y en el análisis además se incluyó el GS “HMS”, específico de la microglía. El análisis del GSEA mostró que ni el GS “*Response to Hypoxia*” ni el GS “HMS” tenían incrementada su expresión en la microglía de los ratones *Elgn3*<sup>-/-</sup>; *APP-PSEN1* (Tabla 11), descartando un papel en la regulación de HIF1 *in vivo*.

GS	Tamaño	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	Rank at max	Leading edge
GO CELLULAR RESPONSE TO VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR STIMULUS	29	0.70	2.17	0.000	0.002	0.002	2137	tags=21%, list=6%, signal=22%
GO REGULATION OF ENDOTHELIAL CELL CHEMOTAXIS	17	0.77	2.04	0.000	0.024	0.055	596	tags=24%, list=2%, signal=24%
GO RESPONSE TO MUSCLE ACTIVITY	19	0.69	1.94	0.000	0.101	0.296	5147	tags=37%, list=13%, signal=42%
GO RESPONSE PLATELET DERIVED GROWTH FACTOR	17	0.72	1.94	0.001	0.079	0.306	2849	tags=29%, list=7%, signal=32%
GO SOMATIC STEM CELL DIVISION	21	0.68	1.94	0.011	0.068	0.323	2122	tags=24%, list=5%, signal=25%
GO SYNAPSIS	32	0.60	1.9	0.000	0.098	0.503	9971	tags=56%, list=26%, signal=76%
GO POSITIVE REGULATION OF PROTEIN DEACETYLATION	15	0.69	1.80	0.002	0.311	0.916	196	tags=13%, list=1%, signal=13%
GO STABILIZATION OF MEMBRANE POTENTIAL	15	0.68	1.79	0.003	0.298	0.935	2459	tags=27%, list=6%, signal=28%
GO POSITIVE REGULATION OF BLOOD VESSEL ENDOTHELIAL CELL MIGRATION	25	0.58	1.75	0.002	0.441	0.994	288	tags=16%, list=1%, signal=16%
GO DOPAMINE METABOLIC PROCESS	23	0.59	1.75	0.002	0.428	0.994	2711	tags=22%, list=7%, signal=23%

Tabla 11. Los 10 GSs de la categoría “*Biological Processes*” que más incrementan su expresión en la microglía aislada de ratones *Elgn3*<sup>-/-</sup>; *APP-PSEN1* versus *APP-PSEN1*. Los 10 GSs de la categoría “*Biological Processes*” que más incrementan su expresión en muestras de microglía CD11b+/CD45+ aislada mediante FACS de ratones de 12 meses de edad *Elgn3*<sup>-/-</sup>; *APP-PSEN1* versus *APP-PSEN1* revelado por GSEA.



### 3.2.3. La ausencia de *Egln3* en el modelo murino *APP-PSEN1* produce en la microglía un incremento del fenotipo DAM, un ajuste metabólico y disminución de la respuesta antiviral

Se ha descrito que la DAM expresa genes protectores que están implicados en fagocitosis (Keren-Shaul et al., 2017), sin embargo, otros autores describen esa firma común como negativa en la progresión de la EA (Krasemann et al., 2017). Decidimos explorar en las muestras de microglía aislada mediante FACS si los genes comunes encontrados en la DAM, GS "MGnD", estaban enriquecidos en la microglía de los ratones *Egln3*<sup>-/-</sup>; *APP-PSEN1* con respecto a la de los ratones *APP-PSEN1*. Para ello se realizó el mismo GSEA que está descrito en el apartado anterior pero además se incluyó la categoría "MGnD", y se observó que este GS tenía incrementada su expresión (Tabla 12).

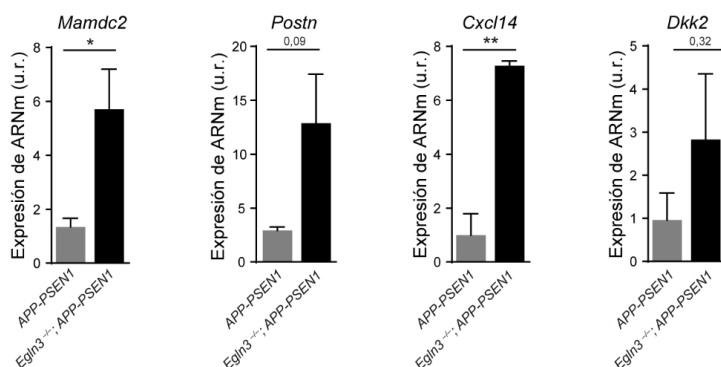
GS	Tamaño	ES	NES	NOM <i>p</i> -val	FDR <i>q</i> -val	FWER <i>p</i> -val	Rank at max	Leading edge
GO CELLULAR RESPONSE TO VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR STIMULUS	29	0.70	2.14	0.000	0.007	0.008	2137	tags=21%, list=6%, signal=22%
GO REGULATION OF ENDOTHELIAL CELL CHEMOTAXIS	17	0.77	2.08	0.000	0.011	0.025	596	tags=24%, list=2%, signal=24%
MGnD	26	0.68	2.03	0.000	0.018	0.062	820	tags=38%, list=2%, signal=39%
GO SOMATIC STEM CELL DIVISION	21	0.68	1.96	0.002	0.057	0.229	2122	tags=24%, list=5%, signal=25%
GO RESPONSE PLATELET DERIVED GROWTH FACTOR	17	0.72	1.94	0.002	0.063	0.309	2849	tags=29%, list=7%, signal=32%
GO RESPONSE TO MUSCLE ACTIVITY	19	0.69	1.92	0.000	0.073	0.400	5147	tags=37%, list=13%, signal=42%
GO SYNAPSIS	32	0.60	1.88	0.000	0.112	0.604	9971	tags=56%, list=26%, signal=76%
GO POSITIVE REGULATION OF PROTEIN DEACETYLATION	15	0.69	1.83	0.002	0.178	0.797	196	tags=13%, list=1%, signal=13%
GO STABILIZATION OF MEMBRANE POTENTIAL	15	0.68	1.78	0.002	0.326	0.970	2459	tags=27%, list=6%, signal=28%
GO STEM CELL DIVISION	28	0.56	1.75	0.002	0.416	0.992	2122	tags=18%, list=5%, signal=29%

Tabla 12. Los 10 GSs de la categoría "Biological Processes" que más incrementan su expresión en la microglía aislada de ratones *Egln3*<sup>-/-</sup>; *APP-PSEN1* versus *APP-PSEN1*. Los 10 GSs de la categoría "Biological Processes" que más incrementan su expresión en muestras de microglía CD11b<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup> aislada mediante FACS de ratones de 12 meses de edad *Egln3*<sup>-/-</sup>; *APP-PSEN1* versus *APP-PSEN1* revelado por GSEA.



## RESULTADOS

Para comprobar si también aumentaba la expresión de genes que se inducen en presencia de A $\beta$ , se midió por qRT-PCR en la microglía aislada mediante FACS de los ratones de 12 meses de edad *Egln3*<sup>-/-</sup>; *APP-PSEN1* y *APP-PSEN1*, el nivel de expresión del ARNm de algunos de los genes que tenían su expresión incrementada en la microglía aislada de los ratones *APP-PSEN1* con respecto a la de los ratones WT (Orre et al., 2014a). Concretamente se midió la expresión del ARNm de *Mamdc2*, *Postn*, *Cxcl14* y *Dkk2*, observándose un incremento estadísticamente significativo de la expresión en *Mamdc2* y *Cxcl14*, y una tendencia al aumento en *Postn* y *Dkk2* al eliminar *Egln3* (Figura 29). Estos datos pertenecientes a mi proyecto de tesis doctoral fueron también incluidos en la tesis de Manuel Alejandro Sánchez García (Sánchez-García, 2018), como apoyo a sus datos experimentales.



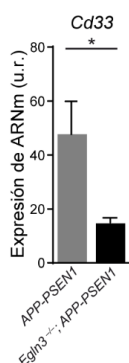
**Figura 29. La ausencia de *Egln3* en el modelo murino de la EA *APP-PSEN1* potencia la respuesta transcripcional en la microglía de genes relacionados con la acumulación de A $\beta$ .** qRT-PCR de los genes *Mamdc2*, *Postn*, *Cxcl14*, *Dkk2*, en muestras de microglía CD11b+/CD45+ aislada mediante FACS de ratones *APP-PSEN1* (barra gris) y *Egln3*<sup>-/-</sup>; *APP-PSEN1* (barra negra). Se usó *Hmbs* como gen control. Se representa la media  $\pm$  error estándar de la media (u.r. unidades relativas). ( $n = 3$ ; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ; prueba  $t$  de Student).

La ganancia de función de *Cd33*, gen implicado en la restricción de la fagocitosis, está relacionada con la EA esporádica (Griciuc et al., 2013). Puesto que resultados previos obtenidos en el laboratorio mostraron un incremento de la fagocitosis y del aclaramiento de A $\beta$  en el cerebro de ratones *Egln3*<sup>-/-</sup>; *APP-PSEN1* con respecto al de ratones *APP-PSEN1* (Sánchez-García, 2018), se midió mediante qRT-PCR el nivel de expresión del ARNm de *Cd33* en las muestras de microglía aislada, observándose una disminución de la expresión de dicho gen en la microglía de los ratones que no tienen *Egln3* (Figura 30), sugiriendo una mejora en el estado de actividad de la microglía.





## RESULTADOS



**Figura 30. La ausencia de *Egln3* en el modelo murino de la EA *APP-PSEN1* disminuye la expresión en la microglía de factores de riesgos genéticos asociados con esta enfermedad.** qRT-PCR del gen *Cd33* en muestras de microglía CD11b+/CD45+ aislada mediante FACS de ratones de 12 meses de edad *APP-PSEN1* (barra gris) y *Elgn3*<sup>-/-</sup>; *APP-PSEN1* (barra negra). Se usó *Hmbs* como gen control. Se representa la media  $\pm$  error estándar de la media (u.r. unidades relativas). ( $n = 3$ ; \*  $p < 0,05$ ; prueba *t* de Student).

Para estudiar las vías moleculares específicas que regula PHD3 en la microglía del ratón modelo de la EA que deposita A $\beta$ , *APP-PSEN1*, se llevó a cabo un GSEA en las muestras de microglía aislada usando la categoría “KEGG Pathway”. Los datos obtenidos fueron también incluidos en la tesis de Manuel Alejandro Sánchez García (Sánchez-García, 2018), como datos de un proyecto llevado a cabo en colaboración por ambos. Se observó que los GSs que más incrementaron su expresión en la microglía aislada de los ratones *Elgn3*<sup>-/-</sup>; *APP-PSEN1* con respecto a la de ratones *APP-PSEN1* estaban todos relacionados con el metabolismo (**Tabla 13**), lo que muestra que la microglía sufre un profundo ajuste metabólico cuando se elimina *Egln3* en los ratones modelos *APP-PSEN1*. Observamos que se produce entre otros un incremento de la expresión de genes relacionados con el metabolismo de ciertos aminoácidos como son la tirosina, la fenilalanina y el triptófano, así como un incremento de los genes implicados en la señalización mediada por receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR; del inglés, *peroxisome proliferator activated receptor*), que codifican enzimas que están implicadas en el metabolismo lipídico (transporte de lípidos, lipogénesis, metabolismo del colesterol, transporte de ácidos grasos, degradación de ácidos grasos). Además también observamos que se produce un incremento de la expresión de genes implicados en la glucólisis y gluconeogénesis. Estudiando la función de cada uno de los genes que encontramos dentro de cada GS observamos que es difícil determinar en qué dirección está actuando la microglía, si hacia un metabolismo catabólico o biosintético, ya que muchos de los genes cuya expresión aparece incrementada dan lugar a una serie de metabolitos que las células pueden emplear tanto para biosíntesis como para degradación (**Tabla 13** y **Figura 31**).

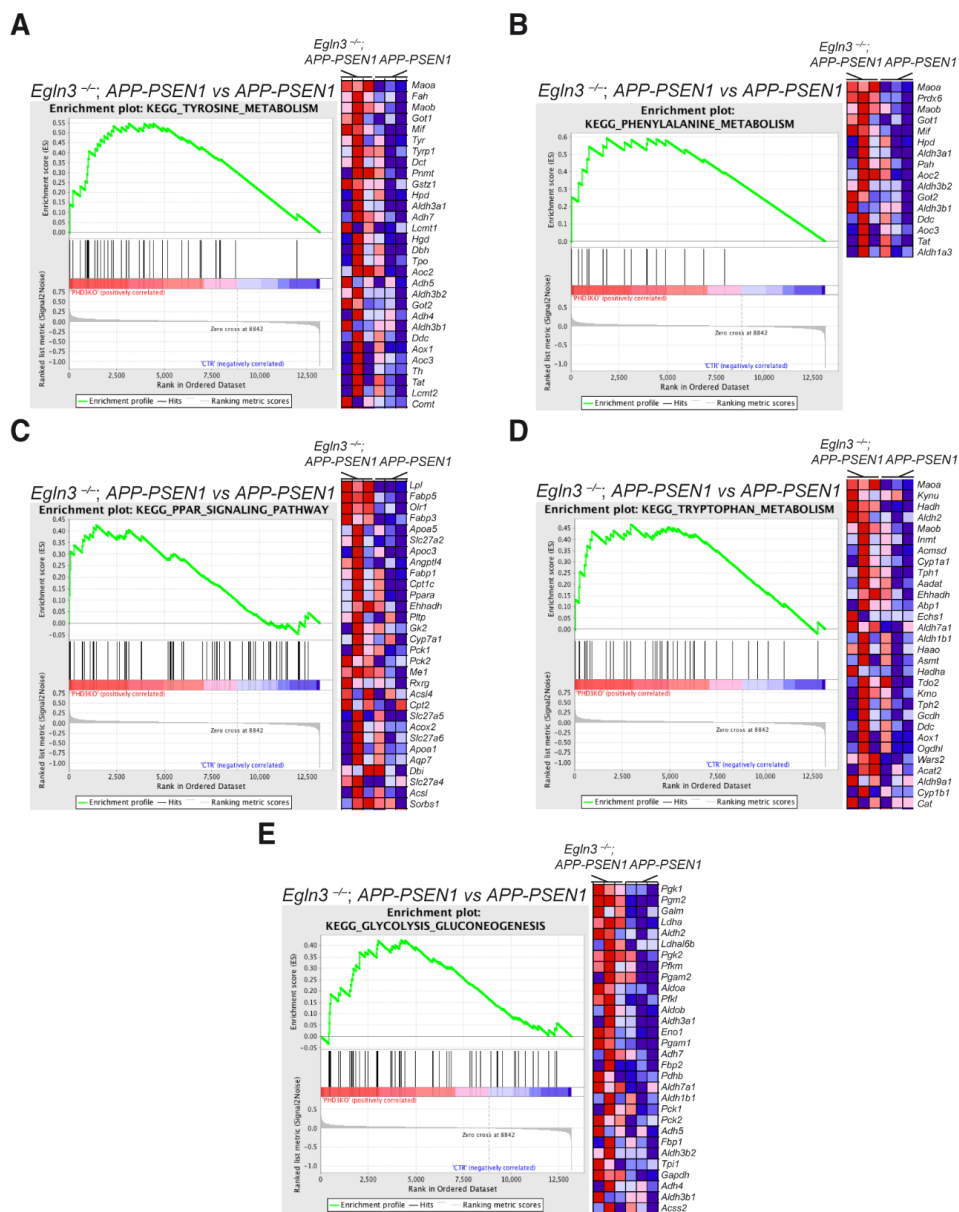


## RESULTADOS

GS	Tamaño	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	Rank at max	Leading edge
KEGG TYROSINE METABOLISM	34	0.55	1.73	0.005	0.428	0.416	3130	tags=53%, list=24%, signal=69%
KEGG METABOLISM OF XENOBIOTICS BY CYTOCHROME P450	36	0.52	1.68	0.009	0.313	0.545	4543	tags=67%, list=35%, signal=102%
KEGG DRUG METABOLISM CYTOCHROME P450	39	0.50	1.64	0.013	0.302	0.688	4543	tags=62%, list=35%, signal=94%
KEGG GLYCOSAMINOGLYCAN DEGRADATION	20	0.58	1.62	0.009	0.271	0.753	1058	tags=35%, list=8%, signal=38%
KEGG PHENYLALANINE METABOLISM	16	0.59	1.59	0.029	0.290	0.841	1846	tags=44%, list=14%, signal=51%
KEGG LYSOSOME	112	0.40	1.55	0.004	0.344	0.925	1159	tags=18%, list=9%, signal=19%
KEGG RETINOL METABOLISM	28	0.51	1.53	0.036	0.347	0.946	4245	tags=61%, list=32%, signal=89%
KEGG PPAR SIGNALING PATHWAY	60	0.43	1.53	0.020	0.306	0.947	1416	tags=18%, list=11%, signal=20%
KEGG TRYPTOPHAN METABOLISM	37	0.47	1.49	0.037	0.349	0.979	2959	tags=41%, list=22%, signal=52%
KEGG GLYCOLYSIS GLUCONEOGENESIS	54	0.42	1.49	0.019	0.315	0.979	4222	tags=52%, list=32%, signal=76%

Tabla 13. Los 10 GSs de la categoría "KEGG Pathway" que más incrementan su expresión en la microglía aislada de ratones *Elgn3*<sup>-/-</sup>; *APP-PSEN1* versus *APP-PSEN1*. Los 10 GSs de la categoría "KEGG Pathway" que más incrementan su expresión en muestras de microglía CD11b<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup> aislada mediante FACS de ratones de 12 meses de edad *Elgn3*<sup>-/-</sup>; *APP-PSEN1* versus *APP-PSEN1* revelado por GSEA.





**Figura 31. La ausencia de *Egn3* en el modelo murino de la EA APP-PSEN1 produce cambios metabólicos en la microglía.** Comparación de expresiones globales entre muestras de microglía CD11b+/CD45+ aislada mediante FACS de ratones de 12 meses de edad *Egn3*<sup>-/-</sup>; APP-PSEN1 versus APP-PSEN1 mediante GSEA. Los gráficos de la izquierda muestran enriquecimiento de diferentes GSs y los paneles de la derecha muestran el *heat map* de los primeros genes que más cambian su expresión en cada caso, simbolizado el rojo incremento de expresión y el azul disminución de expresión. **(A)** GSEA mostrando el enriquecimiento del GS “KEGG Tyrosine Metabolism”. **(B)** GSEA mostrando el enriquecimiento del GS “KEGG Phenylalanine Metabolism”. **(C)** GSEA mostrando el enriquecimiento del GS “KEGG PPAR Signaling Pathway”. **(D)** GSEA mostrando el enriquecimiento del GS “KEGG Tryptophan Metabolism”. **(E)** GSEA mostrando el enriquecimiento del GS “KEGG Glycolysis Gluconeogenesis”.



## RESULTADOS

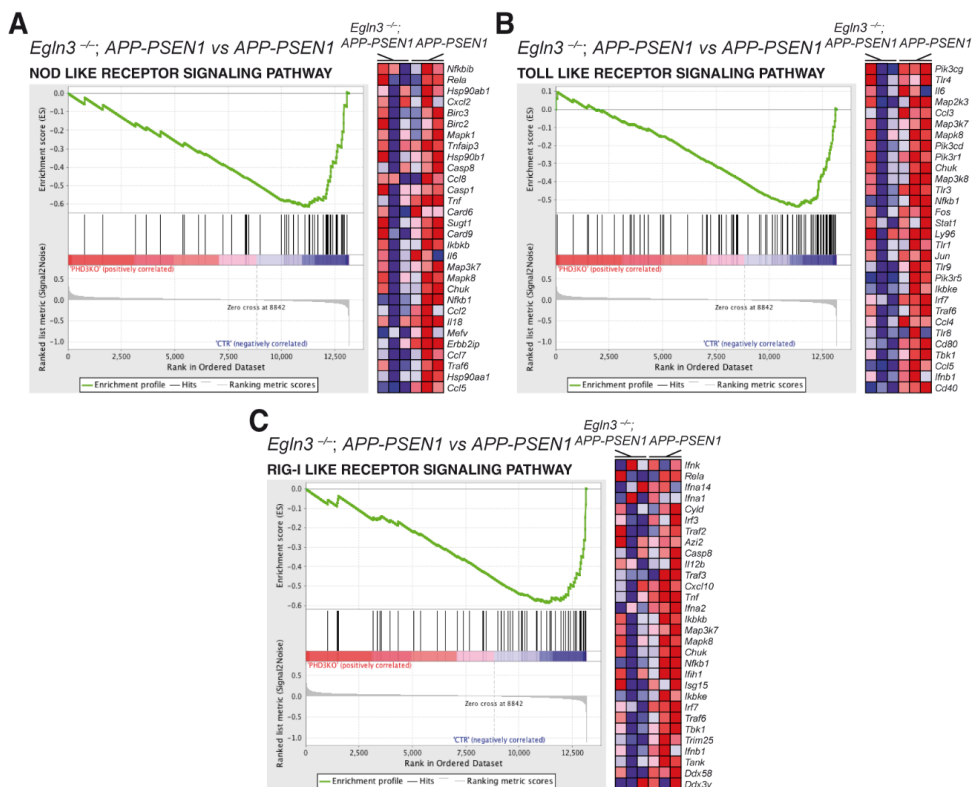
Entre los GSs que presentaron una mayor disminución de su expresión en la microglía aislada de ratones *Eln3* <sup>-/-</sup>; *APP-PSEN1* con respecto a la de ratones *APP-PSEN1*, se encontró en las tres primeras posiciones “*NOD Like Receptor Signaling Pathway*”, “*Toll Like Receptor Signaling Pathway*” y “*RIG-I Like Receptor Signaling Pathway*” (Tabla 14 y Figura 32). “*NOD Like Receptors*” reconocen componentes bacterianos y virales y promueven la activación de la señalización de NF- $\kappa$ B, que conduce a la expresión de genes involucrados en la respuesta inmune innata (Girardin et al., 2003; Inohara et al., 2003). Por otro lado, “*Toll Like Receptors*” son capaces de reconocer componentes de la pared bacteriana así como ácidos nucleicos bacterianos y virales (Kumar et al., 2011) y “*RIG-I Like Receptors*” son considerados esenciales para la respuesta inmune innata contra muchos virus (Kato et al., 2006; Rehwinkel et al., 2010; Weber et al., 2013) además de ser capaces de detectar ARNs bacterianos que se translocan al citosol (Abdullah et al., 2012; Hagmann et al., 2013; Schmolke et al., 2014).

GS	Tamaño	ES	NES	NOM <i>p</i> -val	FDR <i>q</i> -val	FWER <i>p</i> -val	Rank at max	Leading edge
KEGG NOD LIKE RECEPTOR SIGNALING PATHWAY	47	-0.62	-2.34	0.000	0.001	0.001	1881	tags=49%, list=14%, signal=57%
KEGG TOLL LIKE RECEPTOR SIGNALING PATHWAY	95	-0.54	-2.31	0.000	0.001	0.001	1858	tags=46%, list=14%, signal=54%
KEGG RIG I LIKE RECEPTOR SIGNALING PATHWAY	59	-0.59	-2.28	0.000	0.002	0.005	1727	tags=37%, list=13%, signal=43%
KEGG CYTOSOLIC DNA SENSING PATHWAY	47	-0.59	-2.25	0.000	0.002	0.005	1463	tags=38%, list=11%, signal=43%
KEGG B CELL RECEPTOR SIGNALING PATHWAY	71	-0.54	-2.19	0.000	0.003	0.012	968	tags=32%, list=7%, signal=35%
KEGG UBIQUITIN MEDIATED PROTEOLYSIS	123	-0.41	-1.83	0.000	0.079	0.288	2658	tags=41%, list=20%, signal=50%
KEGG NEUROTROPHIN SIGNALING PATHWAY	116	-0.41	-1.82	0.000	0.071	0.300	1802	tags=29%, list=14%, signal=34%
KEGG ERBB SIGNALING PATHWAY	84	-0.43	-1.81	0.000	0.067	0.320	1802	tags=32%, list=14%, signal=37%
KEGG NATURAL KILLER CELL MEDIATED CYTOTOXICITY	98	-0.43	-1.80	0.000	0.063	0.336	2270	tags=40%, list=17%, signal=48%
KEGG GLIOMA	59	-0.46	-1.80	0.003	0.061	0.356	1817	tags=34%, list=14%, signal=39%

Tabla 14. Los 10 GSs de la categoría “*KEGG Pathway*” que más disminuyen su expresión en la microglía



aislada de ratones *Egln3*<sup>-/-</sup>; *APP-PSEN1* versus *APP-PSEN1*. Los 10 GSs de la categoría “KEGG Pathway” que más disminuyen su expresión en muestras de microglía CD11b+/CD45+ aislada mediante FACS de ratones de 12 meses de edad *Egln3*<sup>-/-</sup>; *APP-PSEN1* versus *APP-PSEN1* revelado por GSEA.



**Figura 32.** La ausencia de *Egln3* en el modelo murino de la EA *APP-PSEN1* reprime la respuesta antimicrobiana en la microglía. Comparación de expresiones globales entre muestras de microglía CD11b+/CD45+ aislada mediante FACS de ratones de 12 meses de edad *Egln3*<sup>-/-</sup>; *APP-PSEN1* versus *APP-PSEN1* mediante GSEA. Los gráficos de la izquierda muestran empobrecimiento de GSs antimicrobianos y los paneles de la derecha muestran el *heat map* de los 30 primeros genes enriquecidos en cada caso, simbolizado el rojo incremento de expresión y el azul disminución de expresión. **(A)** GSEA mostrando el empobrecimiento del GS “NOD Like Receptor Signaling Pathway”. **(B)** GSEA mostrando el empobrecimiento del GS “Toll Like Receptor Signaling Pathway”. **(C)** GSEA mostrando el empobrecimiento del GS “RIG-I Like Receptor Signaling Pathway”.

Estos resultados indican que la ausencia de *Egln3* produce cambios en el estado metabólico de la microglía, así como una notable represión de la respuesta antimicrobiana. Además, muchos de los genes que mostraron disminución de su expresión contenidos en los GSs en los que se observó mayor represión, estaban relacionados con la respuesta a IFN-I, mediador esencial de la respuesta antiviral (Lin & Young, 2014).



## RESULTADOS

**3.2.4. La respuesta antiviral está disminuida en la microglía de los ratones *APP-PSEN1* con deficiencia en *Egln3***

IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  son los principales subtipos de interés pertenecientes al grupo IFN-I (Hervás-Stubbs et al., 2011). Para evaluar la relevancia de la respuesta de IFN-I, regulador de las respuestas antivirales, en la microglía del modelo murino de la EA *APP-PSEN1* deficiente en PHD3, se obtuvo una firma de respuesta a IFN- $\beta$  (IFN- $\beta$ S; del inglés, *interferon  $\beta$  signature*) de macrófagos tratados con IFN- $\beta$  (Litvak et al., 2012) y se estudió en las muestras de microglía aislada de los ratones *APP-PSEN1* y *Egln3*  $-/-$ ; *APP-PSEN1*. Se realizó un GSEA usando la categoría “*Biological Processes*” en la que se incluyó el GS “IFN- $\beta$ S”, y se pudo observar que este GS se encontraba reprimido en las muestras de microglía aislada de los ratones *Egln3*  $-/-$ ; *APP-PSEN1* con respecto a la de ratones *APP-PSEN1* (Tabla 15 y Figura 33A), observándose además en este análisis que todos los GSs que disminuían su expresión estaban relacionados con la respuesta a IFN y la respuesta antiviral (Tabla 15). Además, entre los genes DE, encontramos el gen *Ifnb1* (log FC = -0,54,  $p$  = 0,02475) (Tabla suplementaria 8), que codifica para IFN- $\beta$ .

Para confirmar la represión observada de esta IFN- $\beta$ S, se midieron en las muestras de microglía aislada, los niveles de expresión del ARNm de algunos de los genes contenidos en este GS mediante qRT-PCR. Estos datos pertenecientes a mi proyecto de tesis doctoral fueron también incluidos en la tesis de Manuel Alejandro Sánchez García (Sánchez-García, 2018), como apoyo a sus datos experimentales. Concretamente se midió la expresión del ARNm de los genes *Rsad2*, *Trim30d*, *Ifit2*, *Oasl1* e *Irf7*, siendo este último un regulador clave de la respuesta antiviral mediada por IFN- $\beta$  (Litvak et al., 2012). Se pudo observar una disminución estadísticamente significativa de los niveles de expresión del ARNm de *Irf7*, *Rsad2* y *Trim30d*, acompañado por una tendencia a la disminución en los genes *Ifit2* y *Oasl1* en ausencia de *Egln3* (Figura 33B).

Un estudio reciente mostró la importancia que tiene la IFN- $\beta$ S en la microglía de la EA (Friedman et al., 2018), y estudios de GSEA revelaron una fuerte inducción de esta firma en la microglía de dos modelos murinos de la EA que acumulan A $\beta$ , *APP-PSEN1* (Figura 34A) (Orre et al., 2014a) y *5xfAD* (Figura 34B) (Wang et al., 2015).



RESULTADOS

GS	Tamaño	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	Rank at max	Leading edge
GO RESPONSE TO TYPE I INTERFERON	51	-0.72	-2.60	0.000	0.000	0.000	5613	tags=57%, list=15%, signal=66%
GO NEGATIVE REGULATION OF VIRAL GENOME REPLICATION	38	-0.76	-2.54	0.000	0.000	0.000	5832	tags=61%, list=15%, signal=71%
GO NEGATIVE REGULATION OF VIRAL PROCESS	75	-0.64	-2.52	0.000	0.000	0.000	4711	tags=41%, list=12%, signal=47%
GO INTERFERON $\gamma$ MEDIATED SIGNALING PATHWAY	44	-0.69	-2.48	0.000	0.000	0.001	5613	tags=55%, list=15%, signal=64%
GO NEGATIVE REGULATION OF MULTI ORGANISM PROCESS	133	-0.56	-2.41	0.000	0.000	0.001	5832	tags=40%, list=15%, signal=47%
GO REGULATION OF VIRAL GENOME REPLICATION	64	-0.63	-2.40	0.000	0.000	0.001	5066	tags=41%, list=13%, signal=47%
GO REGULATION OF INTERFERON $\alpha$ PRODUCTION	19	-0.80	-2.36	0.000	0.001	0.005	5880	tags=74%, list=15%, signal=87%
GO CELLULAR RESPONSE TO INTERFERON $\gamma$	83	-0.58	-2.35	0.000	0.001	0.006	5757	tags=47%, list=15%, signal=55%
GO DEFENSE RESPONSE TO FUNGUS	28	-0.74	-2.33	0.000	0.001	0.007	1881	tags=21%, list=5%, signal=23%
GO NEGATIVE REGULATION OF TYPE I INTERFERON PRODUCTION	36	-0.69	-2.32	0.000	0.001	0.009	7720	tags=64%, list=20%, signal=80%
GO POSITIVE REGULATION OF TOLL LIKE RECEPTOR SIGNALING PATHWAY	19	-0.78	-2.32	0.000	0.001	0.009	2721	tags=37%, list=7%, signal=40%
GO DEFENSE RESPONSE TO VIRUS	129	-0.54	-2.31	0.000	0.001	0.010	5406	tags=37%, list=14%, signal=43%
GO RESPONSE TO INTERFERON $\gamma$	104	-0.56	-2.30	0.000	0.001	0.012	5757	tags=44%, list=15%, signal=52%
GO REGULATION OF TOLL LIKE RECEPTOR SIGNALING PATHWAY	46	-0.64	-2.28	0.000	0.001	0.014	4201	tags=37%, list=11%, signal=41%
IFN- $\beta$ S	244	-0.48	-2.25	0.000	0.002	0.021	5834	tags=37%, list=15%, signal=44%

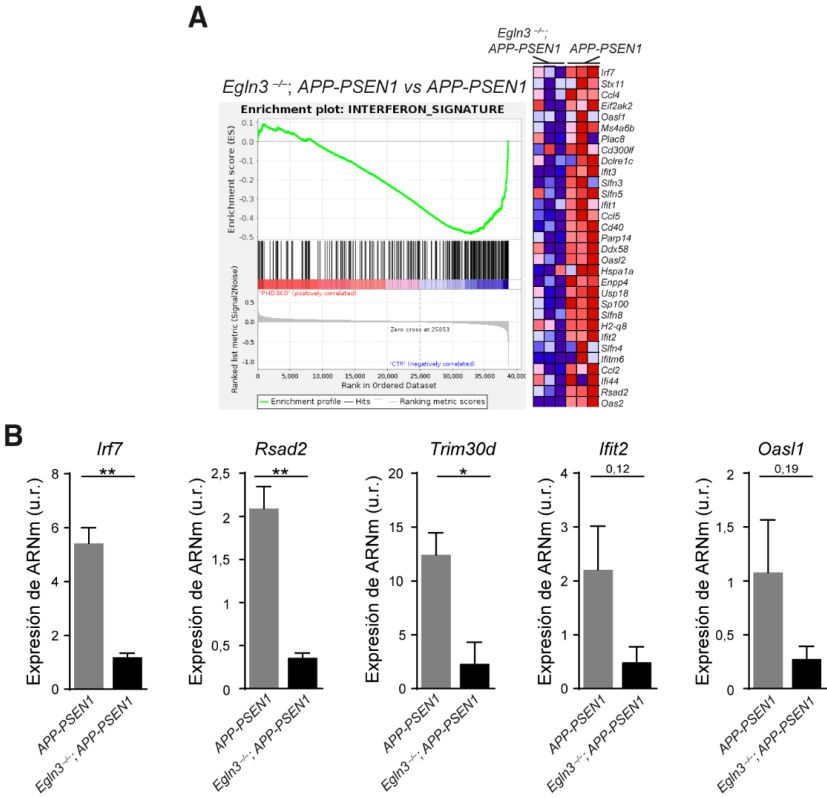
Tabla 15. Los 15 GSs de la categoría “Biological Processes” que más disminuyen su expresión en la microglía aislada de ratones *Elgn3* -/-; *APP-PSEN1* versus *APP-PSEN1*. Los 15 GSs de la categoría “Biological





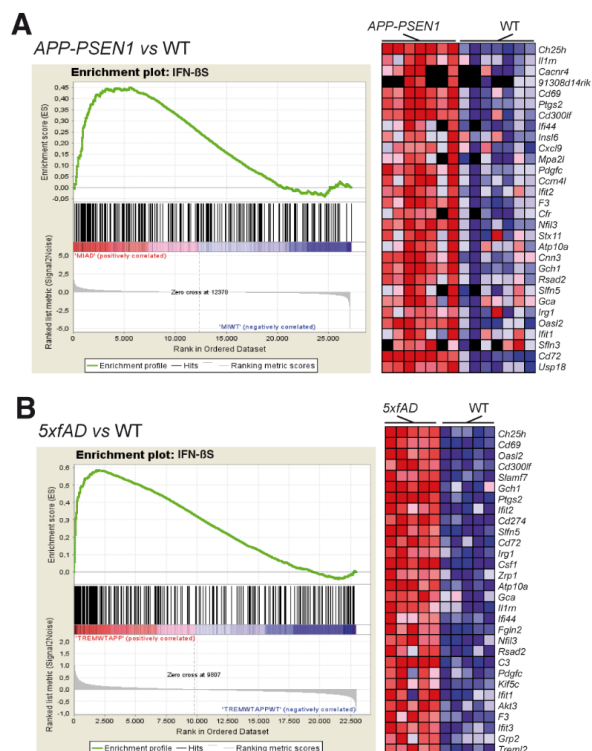
RESULTADOS

Processes” que más disminuyen su expresión en de microglía CD11b+/CD45+ aislada mediante FACS de ratones de 12 meses de edad *Egln3*<sup>-/-</sup>; *APP-PSEN1* versus *APP-PSEN1* revelado por GSEA.



**Figura 33. La ausencia de *Egln3* en el modelo murino de la EA *APP-PSEN1* reprime la IFN-βS en la microglía. (A)** Comparación de expresiones globales entre muestras de microglía CD11b+/CD45+ aislada mediante FACS de ratones de 12 meses de edad *Egln3*<sup>-/-</sup>; *APP-PSEN1* versus *APP-PSEN1* mediante GSEA. El gráfico de la izquierda muestra el empobrecimiento del GS “IFN-βS” (Litvak et al., 2012) y el panel de la derecha muestra el *heat map* de los 30 genes que más cambian su expresión en este GS, simbolizado el rojo incremento de expresión y el azul disminución de expresión. **(B)** qRT-PCR de algunos genes contenidos en la IFN-βS (*Irf7*, *Rsad2*, *Trim30d*, *Ifit2*, *Oasl1*), en muestras de microglía CD11b+/CD45+ aislada mediante FACS de ratones *APP-PSEN1* (barra gris) y *Egln3*<sup>-/-</sup>; *APP-PSEN1* (barra negra). Se usó *Hmbs* como gen control. Se representa la media ± error estándar de la media (u.r. unidades relativas). (n = 3; \* p < 0,05, \*\* p < 0,01; prueba t de Student).





**Figura 34. La IFN-βS está incrementada en la microglía de diferentes modelos murinos de la EA que acumulan Aβ.** Comparación de expresiones globales entre muestras de microglía aislada de diferentes ratones modelos de la EA mediante GSEA. Los gráficos de la izquierda muestran el enriquecimiento del GS "IFN-βS" (Litvak et al., 2012) y los paneles de la derecha muestran el *heat map* de los 30 primeros genes enriquecidos en cada caso, simbolizando el rojo incremento de expresión y el azul disminución de expresión. **(A)** GSEA mostrando el enriquecimiento del GS "IFN-βS" en la comparación entre muestras de microglía aislada de ratones de 15-18 meses de edad *APP-PSEN1* versus WT (Orre et al., 2014a). **(B)** GSEA mostrando el enriquecimiento del GS "IFN-βS" en la comparación entre muestras de microglía aislada de ratones de 8,5 meses de edad *5xfAD* versus WT (Wang et al., 2015).

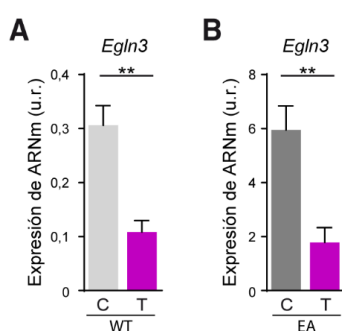
En global, la deficiencia de PHD3 aumenta la respuesta de la microglía a Aβ de manera generalizada, pero disminuye específicamente la respuesta antiviral.

Todos los resultados observados anteriormente fueron obtenidos a partir de un modelo murino en el que *Egln3* se elimina por completo en todas las células desde el nacimiento, por lo que podríamos pensar en respuestas independientes de microglía que contribuyen a la mejora observada en modelos de EA (Sánchez-García, 2018). Para estimar qué parte de la respuesta dependía de microglía decidimos explorar los cambios que sucederían si se eliminase *Egln3* de forma específica en la microglía de ratones adultos. Para realizar este estudio se usó el ratón *Cx3cr1-Cre::ERT2; Egln3<sup>Flox/Flox</sup>*, que en presencia de TMX es capaz de eliminar *Egln3* específicamente en las células del sistema inmune innato, y se cruzó con nuestro modelo murino *APP-PSEN1*. Estos ratones se trataron con TMX a los 2 meses de edad durante 30 días y se usaron para experimentación cuando tenían entre 6 y 7 meses de edad.



## RESULTADOS

En primer lugar se aisló mediante FACS la microglía CD11b+/CD45+ (Orre et al., 2014b) de 4 grupos experimentales: *Cx3cr1-Cre::ERT2; EglN3<sup>Flox/Flox</sup>* no tratados con TMX, *Cx3cr1-Cre::ERT2; EglN3<sup>Flox/Flox</sup>* tratados con TMX, *Cx3cr1-Cre::ERT2; EglN3<sup>Flox/Flox</sup>; APP-PSEN1* no tratados con TMX y *Cx3cr1-Cre::ERT2; EglN3<sup>Flox/Flox</sup>; APP-PSEN1* tratados con TMX. Para comprobar si el tratamiento con TMX había sido efectivo, se midió mediante qRT-PCR los niveles de expresión del ARNm de *EglN3* en las muestras de microglía aislada, observándose tanto en los animales que no acumulan A $\beta$  (**Figura 35A**) como en los que sí (**Figura 35B**), una reducción significativa de los niveles de expresión de *EglN3*.

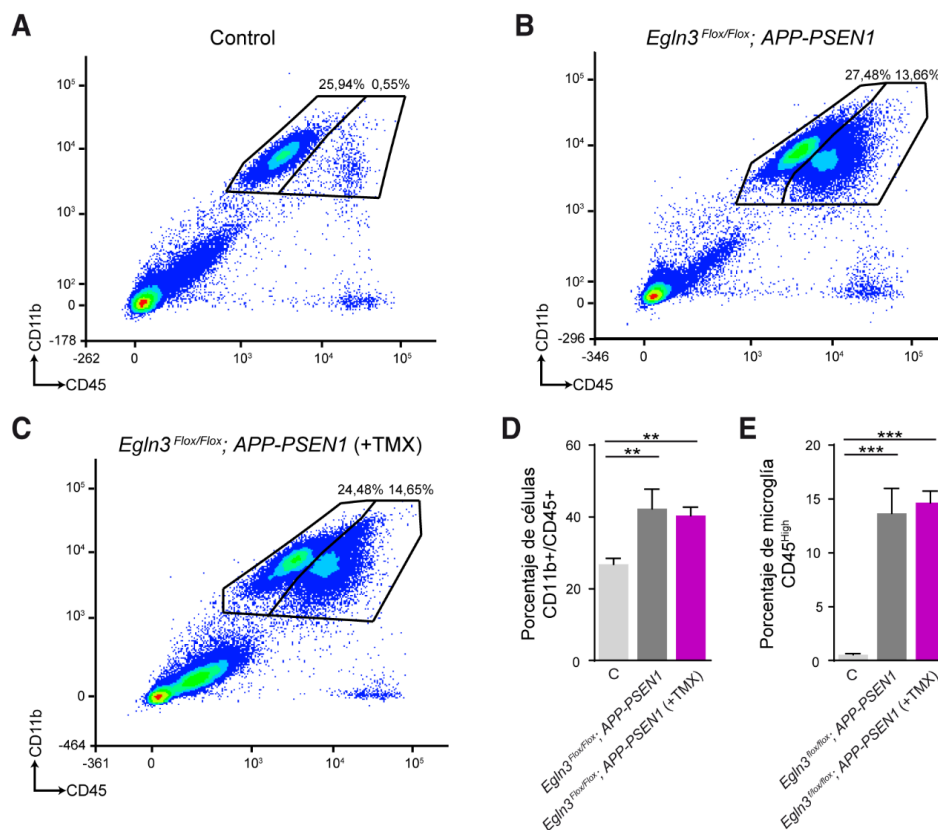


Para explorar un posible papel de la ausencia específica de *EglN3* en la microglía adulta, se midió la proporción de microglía CD11b+/CD45+ por citometría de flujo (Orre et al., 2014b) en 3 grupos experimentales: control, que incluye *Cx3cr1-Cre::ERT2; EglN3<sup>Flox/Flox</sup>* no tratados y tratados con TMX, ya que no se observaron diferencias en ninguno de los parámetros evaluados por citometría de flujo, *Cx3cr1-Cre::ERT2; EglN3<sup>Flox/Flox</sup>; APP-PSEN1* no tratados con TMX y *Cx3cr1-Cre::ERT2; EglN3<sup>Flox/Flox</sup>; APP-PSEN1* tratados con TMX. Se seleccionó la población microglial según la estrategia descrita en la sección de materiales y métodos (**Figura 47**). La población de microglía CD11b+/CD45+ se muestra contenida en los recuadros representados (**Figura 36A-C**).

Se observó un incremento estadísticamente significativo de la proporción de población microglial CD11b+/CD45+ en aquellos ratones que acumulan A $\beta$ , *APP-PSEN1*, con respecto al grupo control. Sin embargo, entre los ratones *Cx3cr1-Cre::ERT2; EglN3<sup>Flox/Flox</sup>; APP-PSEN1* no tratados y los tratados con TMX, no se observaron diferencias (**Figura 36D**). Otro parámetro medido fue la polarización de la población microglial, observándose que en aquellos ratones donde hay acumulación de A $\beta$  la población de microglía era más CD45 positiva, llegándose incluso a distinguir dos poblaciones microgliales, pero entre la microglía de los ratones *Cx3cr1-Cre::ERT2; EglN3<sup>Flox/Flox</sup>; APP-PSEN1* no tratados y la de los tratados con TMX no se observaron diferencias (**Figura 36E**).



## RESULTADOS



**Figura 36. La proliferación microglial y la expresión de la proteína de superficie CD45 no se ven afectadas por la disminución de la expresión de *Egln3* de forma específica en las células de microglía.** (A-C) Gráficos de densidad de citometría de flujo de muestras de microglía aislada *ex vivo* de ratones de 6 meses de edad de diferentes genotipos. La microglía se incluye en los recuadros representados y se caracteriza por la expresión superficial de CD45 y CD11b. Se muestran los porcentajes representativos de las subpoblaciones microgliales según los niveles de expresión de la proteína CD45. (A) Gráficos de densidad de ratones control (*Egln3*<sup>Flox/Flox</sup> y *Egln3*<sup>Flox/Flox</sup> tratados con TMX durante 30 días). (B) Gráficos de densidad de ratones *Egln3*<sup>Flox/Flox</sup>; APP-PSEN1. (C) Gráficos de densidad de ratones *Egln3*<sup>Flox/Flox</sup>; APP-PSEN1 tratados con TMX 30 días. (D) Cuantificación de la proporción de microglía total con respecto a todas las células aisladas registradas en los gráficos de densidad A-C. Se representa la media ± error estándar de la media (n = 6-9; \*\* p < 0,01; test ANOVA seguido del test de Tukey). (E) Cuantificación de la subpoblación microglial CD45<sup>High</sup> con respecto a subpoblación microglial total de todas las células aisladas registradas en los gráficos de densidad A-C. Se representa la media ± error estándar de la media (n = 6-9; \*\*\* p < 0,001; test ANOVA seguido del test de Tukey).

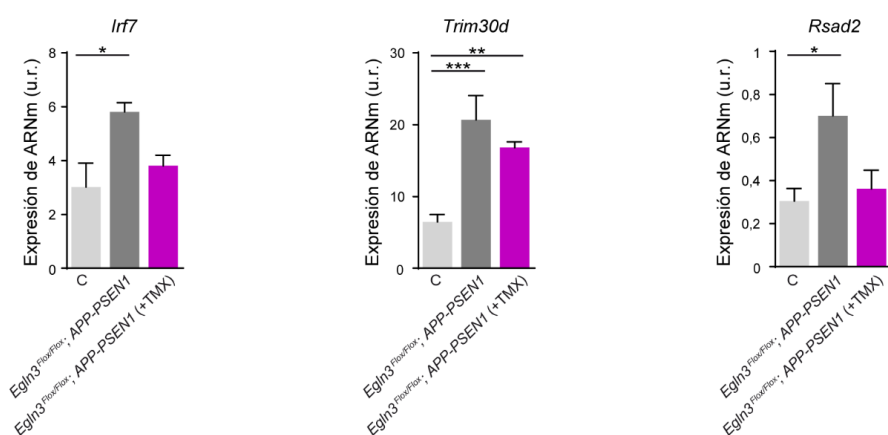
Dado que se observó reducción de los niveles de expresión de *Egln3* en la microglía al tratar con TMX los ratones *Cx3cr1-Cre::ERT2*; *Egln3*<sup>Flox/Flox</sup> y *Cx3cr1-Cre::ERT2*; *Egln3*<sup>Flox/Flox</sup>; APP-PSEN1, se decidió estudiar si los cambios transcripcionales producidos en los genes de la IFN-βS en la microglía de ratones *Egln3*<sup>-/-</sup>; APP-PSEN1 con respecto a los ratones APP-PSEN1, se producían también cuando se elimina *Egln3* de forma específica en la microglía de ratones adultos.

Para ello, en las muestras de microglía aislada mediante FACS de los ratones control, *Cx3cr1-Cre::ERT2*; *Egln3*<sup>Flox/Flox</sup>; APP-PSEN1 no tratados y *Cx3cr1-Cre::ERT2*; *Egln3*<sup>Flox/Flox</sup>; APP-PSEN1 tratados con TMX, se midió mediante qRT-PCR el nivel de expresión del ARNm de algunos de los



## RESULTADOS

genes contenidos en la IFN- $\beta$ S. Se observó un aumento estadísticamente significativo de la expresión de *Irf7*, *Trim30d* y *Rsad2* en la microglía de ratones que acumulan A $\beta$ , y al tratar con TMX estos ratones la expresión de estos genes tendió a disminuir, sin llegar a ser esta disminución estadísticamente significativa (**Figura 37**). En el caso del gen *Irf7*, si solo se hace el análisis estadístico comparando la microglía aislada de los ratones *Cx3cr1-Cre::ERT2*; *Egln3*<sup>Flox/Flox</sup>; *APP-PSEN1* no tratados y tratados con TMX, sin tener en cuenta el grupo control para así ganar poder estadístico, sí que se observa una disminución estadísticamente significativa de los niveles de expresión del ARNm, llegando a alcanzarse un *p* de 0,0063.



**Figura 37. La disminución de expresión de *Egln3* de forma específica en la microglía del modelo murino *APP-PSEN1* reprime la expresión de genes de la IFN- $\beta$ S.** qRT-PCR de los genes *Irf7*, *Trim30d* y *Rsad2* en muestras de microglía aislada de ratones de 6 meses de edad control (*Egln3*<sup>Flox/Flox</sup> y *Egln3*<sup>Flox/Flox</sup> tratados con TMX durante 30 días; barra gris clara), *Egln3*<sup>Flox/Flox</sup>; *APP-PSEN1* (barra gris oscura) y *Egln3*<sup>Flox/Flox</sup>; *APP-PSEN1* tratados con TMX durante 30 días (barra magenta). Se usó *Hmbs* como gen control. Se representa la media  $\pm$  error estándar de la media (u.r. unidades relativas). (*n* = 4-7; \* *p* < 0,05; \*\* *p* < 0,01; \*\*\* *p* < 0,001; test ANOVA seguido del test de Tukey).

Por lo tanto la eliminación de *Egln3* de manera específica en la microglía de ratones adultos disminuye los niveles de expresión de los genes de la IFN- $\beta$ S aunque esta disminución no llega a ser estadísticamente significativa en todos los casos.

### 3.2.5. Algunos genes sirven como marcadores genéticos a nivel de corteza para observar los cambios que se producen en microglía al eliminar *Egln3* en los ratones *APP-PSEN1*

Como se mencionó anteriormente, en nuestro modelo inicial de deficiencia de *Egln3*, este gen se ha eliminado en todas las células, por lo que podríamos pensar en respuestas independientes de microglía que contribuyeran a la mejora observada en modelos de EA (Sánchez-García, 2018). Otra manera que nos permitió estimar qué parte de la respuesta dependía de microglía, fue el estudio transcriptional de la corteza de ratones *APP-PSEN1* y *Egln3*<sup>-/-</sup>; *APP-PSEN1* de 6 y 12 meses



## RESULTADOS

de edad, donde encontramos variabilidad de tipos celulares. Para ello se realizó un GSEA en las muestras de corteza usando la categoría “KEGG Pathway”, a la que adicionalmente se añadieron los GSs “PHD3KO UP” y “PHD3KO DOWN”, en los que se incluyeron aquellos genes DE en el microarray de microglía aislada de ratones *Elgn3*<sup>-/-</sup>; *APP-PSEN1* con respecto a ratones *APP-PSEN1* de 12 meses de edad que cumplieran con el siguiente requisito:  $\log FC > 0,5$  y  $p < 0,01$  para el GS “PHD3KO UP” (Tabla suplementaria 9) y  $\log FC < -0,5$  y  $p < 0,01$  para el GS “PHD3KO DOWN” (Tabla suplementaria 10).

Como resultado se obtuvo, que en las muestras de corteza de ratones de 6 meses de edad, el GS que incrementaba más su expresión en ratones *Elgn3*<sup>-/-</sup>; *APP-PSEN1* con respecto a ratones *APP-PSEN1* fue el GS “PHD3KO UP” (Tabla 16), siendo también el GS “PHD3KO DOWN” el que mostró una mayor represión de la expresión (Tabla 17). En las muestras de corteza de ratones de 12 meses de edad, se encontró que el GS “PHD3KO UP” se encontraba en segunda posición de entre los GSs que más aumentaban su expresión (Tabla 18), estando el GS “PHD3KO DOWN” en la tercera posición de entre los GSs que más disminuyen su expresión (Tabla 19). Observamos que los GSs que más cambian su expresión en los ratones de 6 y 12 meses son diferentes, siendo los GS “PHD3KO UP” y “PHD3KO DOWN” los que encontramos como punto común a ambas edades. Por lo tanto, de manera global, a nivel de corteza observamos que la eliminación de *Egln3*, produce cambios transcripcionales en los mismos genes que observamos en la microglía que estaban regulados por *Egln3*.

GS	Tamaño	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	Rank at max	Leading edge
PHD3KO UP	99	0.53	2.05	0.000	0.008	0.016	1871	tags=25%, list=11%, signal=28%
KEGG OLFACTORY TRANSDUCTION	221	0.45	1.96	0.000	0.014	0.038	480	tags=28%, list=3%, signal=28%
KEGG GLYCOSYL- PHOSPHATIDYL- INOSITOL GPI ANCHOR BIOSYNTHESIS	24	0.58	1.70	0.022	0.161	0.472	4464	tags=54%, list=27%, signal=74%
KEGG BIOSYNTHESIS OF UNSATURATED FATTY ACIDS	19	0.59	1.61	0.019	0.273	0.735	4242	tags=74%, list=25%, signal=98%
KEGG ALANINE ASPARTATE AND GLUTAMATE METABOLISM	30	0.52	1.60	0.019	0.243	0.757	4026	tags=43%, list=24%, signal=57%

Tabla 16. Los 5 GSs de la categoría “KEGG Pathway” que más incrementan su expresión en la corteza de ratones de 6 meses de edad *Elgn3*<sup>-/-</sup>; *APP-PSEN1* versus *APP-PSEN1*. Los 5 GSs que más incrementan su expresión en muestras de corteza de ratones de 6 meses de edad *Elgn3*<sup>-/-</sup>; *APP-PSEN1* versus *APP-PSEN1* revelado por GSEA.



## RESULTADOS

GS	Tamaño	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	Rank at max	Leading edge
PHD3KO DOWN	38	-0.72	-2.25	0.000	0.000	0.000	1482	tags=39%, list=9%, signal=43%
KEGG RIBOSOME	81	-0.55	-2.00	0.000	0.018	0.037	5295	tags=62%, list=32%, signal=90%
KEGG GRAFT VERSUS HOST DISEASE	19	-0.55	-1.50	0.057	1.000	0.970	600	tags=26%, list=4%, signal=27%
KEGG PPAR SIGNALING PATHWAY	66	-0.41	-1.49	0.028	0.898	0.979	1204	tags=17%, list=7%, signal=18%
KEGG JAK STAT SIGNALING PATHWAY	131	-0.36	-1.42	0.022	1.000	0.997	2948	tags=24%, list=18%, signal=29%

Tabla 17. Los 5 GSs de la categoría “KEGG Pathway” que más disminuyen su expresión en la corteza de ratones de 6 meses de edad *Elgn3*<sup>-/-</sup>; *APP-PSEN1* versus *APP-PSEN1*. Los 5 GSs que más disminuyen su expresión en muestras de corteza de ratones de 6 meses de edad *Elgn3*<sup>-/-</sup>; *App-Psen1* versus *APP-PSEN1* revelado por GSEA.

GS	Tamaño	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	Rank at max	Leading edge
KEGG OLFACTORY TRANSDUCTION	221	0.58	2.20	0.000	0.000	0.000	1183	tags=36%, list=7%, signal=38%
PHD3KO UP	99	0.59	2.10	0.000	0.000	0.000	2683	tags=35%, list=16%, signal=42%
KEGG AUTOIMMUNE THYROID DISEASE	23	0.68	1.92	0.000	0.003	0.018	4632	tags=78%, list=28%, signal=108%
KEGG PRIMARY IMMUNODEFICIENCY	32	0.61	1.87	0.000	0.006	0.043	3704	tags=53%, list=22%, signal=68%
KEGG ALLOGRAFT REJECTION	21	0.66	1.86	0.000	0.005	0.050	4632	tags=71%, list=28%, signal=98%

Tabla 18. Los 5 GSs de la categoría “KEGG Pathway” que más incrementan su expresión en la corteza de ratones de 12 meses de edad *Elgn3*<sup>-/-</sup>; *APP-PSEN1* versus *APP-PSEN1*. Los 5 GSs que más incrementan su expresión en muestras de corteza de ratones de 12 meses de edad *Elgn3*<sup>-/-</sup>; *APP-PSEN1* versus *APP-PSEN1* revelado por GSEA.





## RESULTADOS

GS	Tamaño	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	Rank at max	Leading edge
KEGG AMINOACYL TRNA BIOSYNTHESIS	40	-0.59	-2.40	0.000	0.000	0.000	2881	tags=52%, list=17%, signal=63%
KEGG UBIQUITIN MEDIATED PROTEOLYSIS	132	-0.44	-2.31	0.000	0.002	0.001	3793	tags=48%, list=23%, signal=62%
PHD3KO DOWN	38	-0.55	-2.27	0.000	0.003	0.003	1246	tags=24%, list=7%, signal=26%
KEGG RENAL CELL CARCINOMA	70	-0.46	-2.11	0.000	0.010	0.013	3608	tags=40%, list=21%, signal=51%
KEGG RNA DEGRADATION	55	-0.48	-2.06	0.000	0.015	0.024	4075	tags=55%, list=24%, signal=72%

**Tabla 19. Los 5 GSs de la categoría “KEGG Pathway” que más disminuyen su expresión en la corteza de ratones de 12 meses de edad *Egln3* <sup>-/-</sup>; APP-PSEN1 versus APP-PSEN1.** Los 5 GSs que más disminuyen su expresión en muestras de corteza de ratones de 12 meses de edad *Egln3* <sup>-/-</sup>; APP-PSEN1 versus APP-PSEN1 revelado por GSEA.

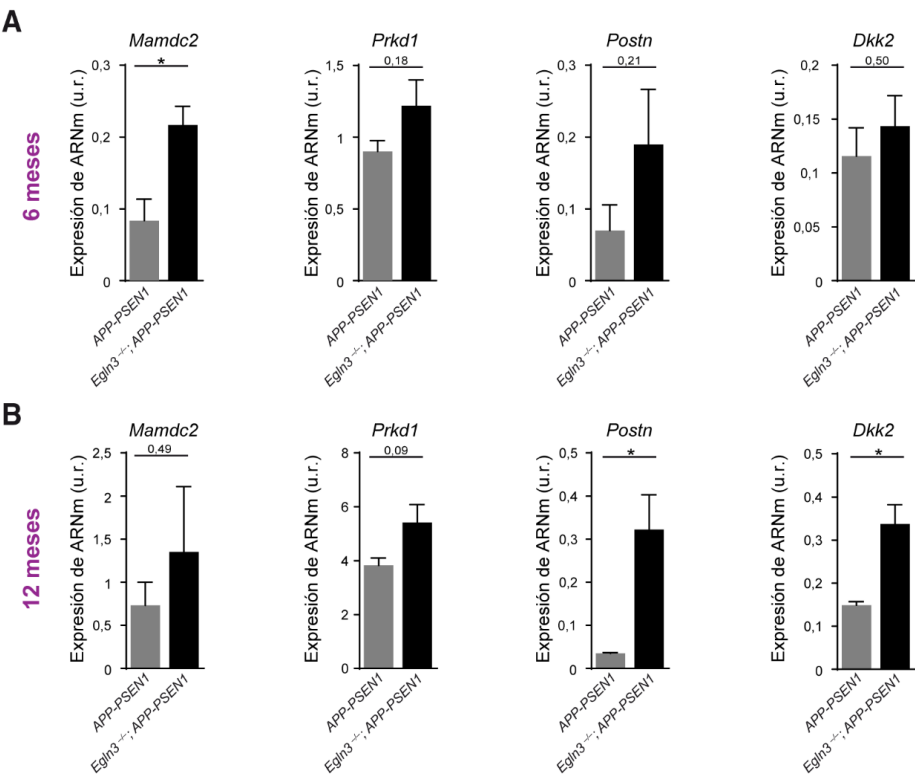
Con estos datos decidimos seleccionar algunos de los genes incluidos en los GSs “PHD3KO UP” y “PHD3KO DOWN” y explorar si podrían usarse como marcadores genéticos para ver a nivel de corteza lo que está sucediendo en la microglía. Para ello se midió la expresión del ARNm mediante qRT-PCR de los genes *Mamdc2*, *Prkd1*, *Postn* y *Dkk2* del GS “PHD3KO UP”, *Rsad2*, *Trim30d*, *Mid1* y *Ccl5* del GS “PHD3KO DOWN” y además también medimos la expresión del ARNm de *Irf7*, *Ifit2* y *Oasl1* que habían mostrado disminución de su expresión en los análisis anteriores realizados en la microglía.

De entre los genes que incrementaban su expresión, se observó un aumento estadísticamente significativo de *Mamdc2* en las muestras de corteza de ratones de 6 meses de edad al eliminar *Egln3*, acompañado por una tendencia al aumento en el resto de genes estudiados (**Figura 38A**), mientras que en las muestras de corteza de ratones de 12 meses, los genes que mostraron un incremento estadísticamente significativo de la expresión fueron *Postn* y *Dkk2*, observándose una tendencia al incremento en el resto de genes. (**Figura 38B**).

De entre los genes estudiados que mostraban disminución de su expresión en las muestras de microglía aislada, se observó en muestras de corteza de ratones de 6 y 12 meses de edad en los que se había eliminado *Egln3*, que el único gen que disminuía su expresión de forma estadísticamente significativa en ambos casos era *Trim30d*, observando en el resto de genes una tendencia a la disminución de su expresión (**Figura 39**).



RESULTADOS



**Figura 38. En muestras de corteza del modelo murino APP-PSEN deficiente en Egn3 también se observa incremento de la expresión de genes relacionados con la acumulación de Aβ.** qRT-PCR de algunos genes contenidos en el GS “PHD3KO UP” (*Mamdc2*, *Prkd1*, *Postn* y *Dkk2*) en muestras de corteza de ratones de 6 y 12 meses de edad APP-PSEN1 (barra gris) y Egn3<sup>-/-</sup>; APP-PSEN1 (barra negra). **(A)** qRT-PCR en muestras de corteza de ratones de 6 meses de edad. Se usó *Hmbs* como gen control. Se representa la media ± error estándar de la media (u.r. unidades relativas). (n = 3-4; \* p < 0,05; prueba t de Student). **(B)** qRT-PCR en muestras de corteza de ratones de 12 meses de edad. Se usó *Hmbs* como gen control. Se representa la media ± error estándar de la media (u.r. unidades relativas). (n = 3; \* p < 0,05; prueba t de Student).



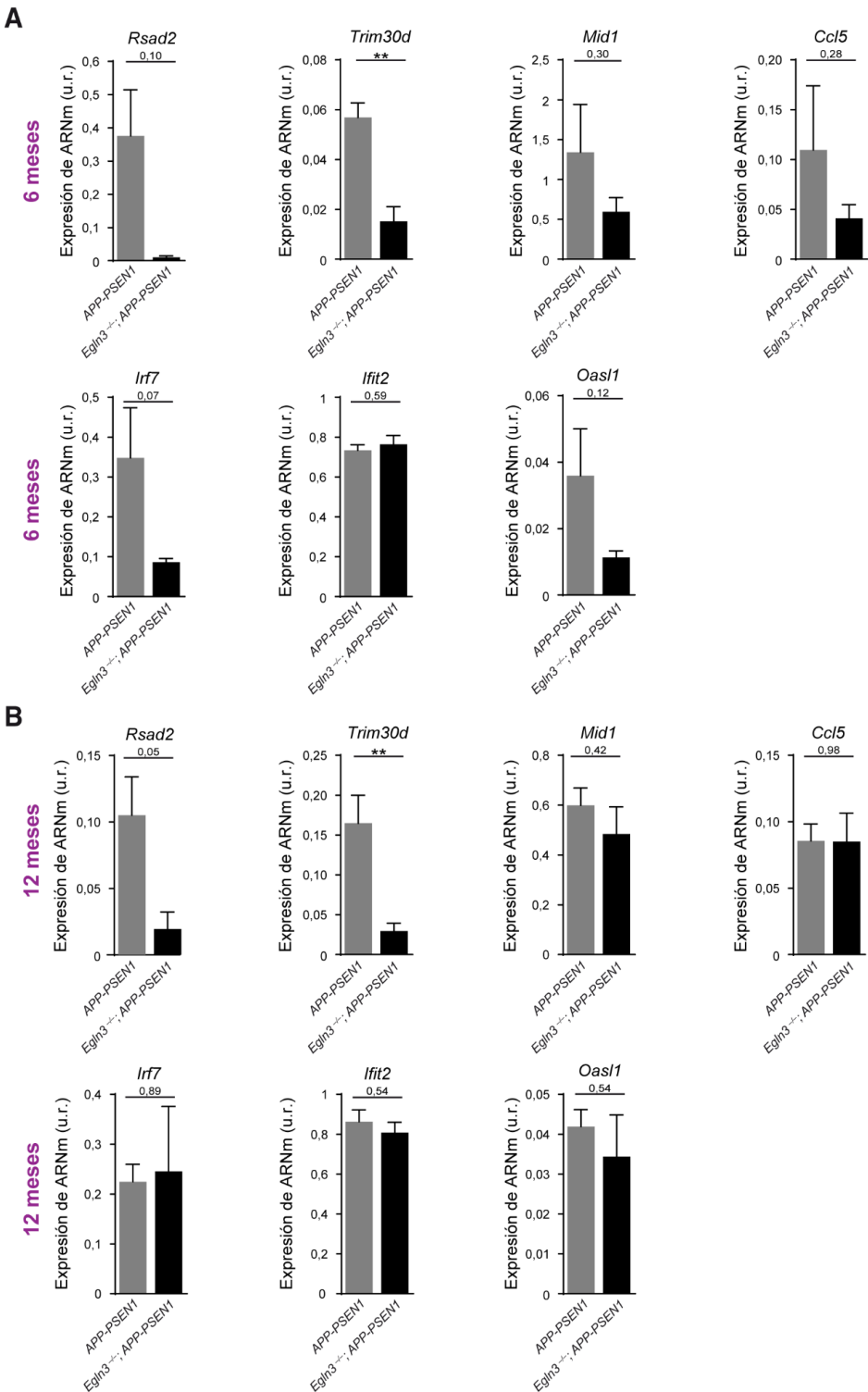


Figura 39. La disminución de la expresión de algunos genes observada en la microglía del modelo



## RESULTADOS

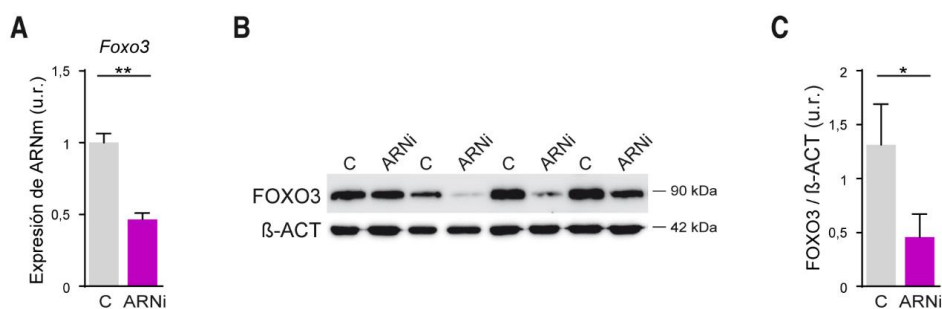
**murino APP-PSEN1 deficiente en Egl3 también se observa parcialmente en muestras de corteza.** qRT-PCR de algunos genes contenidos en el GS "PHD3KO DOWN" (*Rsad2*, *Trim30d*, *Mid1* y *Ccl5*) y de *Irf7*, *Ifit2* y *Oasl1* en muestras de corteza de ratones de 6 y 12 meses de edad APP-PSEN1 (barra gris) y *Egl3*<sup>-/-</sup>; APP-PSEN1 (barra negra). (A) qRT-PCR en muestras de corteza de ratones de 6 meses de edad. Se usó *Hmbs* como gen control. Se representa la media  $\pm$  error estándar de la media (u.r. unidades relativas). ( $n = 3-5$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; prueba *t* de Student). (B) qRT-PCR en muestras de corteza de ratones de 12 meses de edad. Se usó *Hmbs* como gen control. Se representa la media  $\pm$  error estándar de la media (u.r. unidades relativas). ( $n = 3$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; prueba *t* de Student).

Estos datos muestran que algunos genes, como *Mamdc2*, *Postn*, *Dkk2* y *Trim30d* podrían usarse como marcadores corticales para ver los cambios que se están produciendo en las células microgliales.

### 3.2.6. FOXO3 regula la expresión de los genes de la IFN- $\beta$ S en microglía primaria e interacciona con PHD3

Se ha descrito que FOXO3 es un factor de transcripción que actúa como represor de la expresión de los genes de la IFN- $\beta$ S en macrófagos (Litvak et al., 2012). Con los resultados previamente obtenidos nos preguntamos si en la microglía FOXO3 también actúa reprimiendo la expresión de los genes implicados en la respuesta antiviral. Para ello se realizaron experimentos de interferencia del ARN usando ARN interferente (ARNi) de *Foxo3a* en cultivos primarios de microglía de ratón.

Para comprobar si el sistema genético funcionaba, se midieron tanto los niveles de expresión del ARNm de *Foxo3a* por qRT-PCR (Figura 40A), como los niveles de expresión a nivel de proteína mediante WB (Figuras 40B y 40C), observándose en ambos casos una disminución de la expresión.

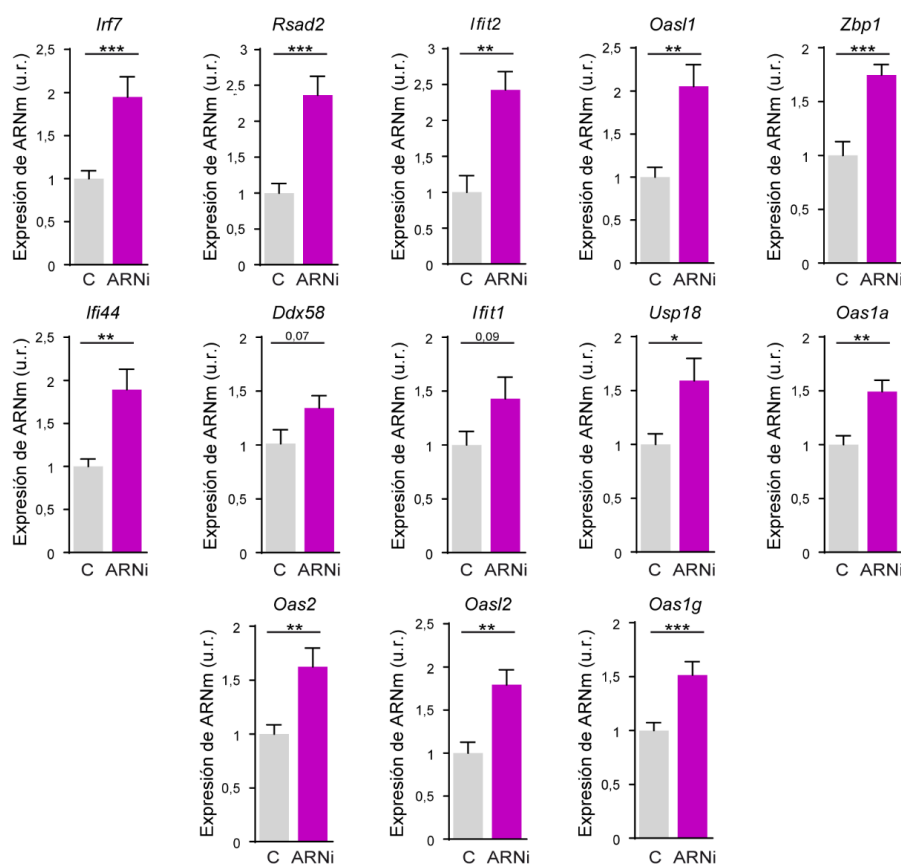


**Figura 40. El tratamiento con ARNi de *Foxo3a* disminuye la expresión de dicho gen y de la proteína que codifica en muestras de cultivos primarios de microglía de ratón.** qRT-PCR, WB y cuantificación del WB de muestras de cultivos primarios de microglía tratados con ARNi de *Sima* (control; C; barra gris) o ARNi de *Foxo3a* (ARNi; barra magenta) durante 4 horas. (A) qRT-PCR del gen *Foxo3a*. Se usó *Hmbs* como gen control. Se representa la media  $\pm$  error estándar de la media (u.r. unidades relativas). ( $n = 10-12$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; prueba *t* de Student). (B) Imágenes representativas de 4 experimentos independientes de WB para la proteína FOXO3 con  $\beta$ -ACTINA ( $\beta$ -ACT) como control de carga. (C) Cuantificación del WB descrito en B, usando medidas relativas a  $\beta$ -ACT. Se representa la media  $\pm$  error estándar de la media (u.r. unidades relativas). ( $n = 6$ ; \*  $p < 0,05$ ; prueba *t* de Student).



## RESULTADOS

Una vez optimizado el silenciamiento de *Foxo3a* en los cultivos primarios de microglía, se midió en estas muestras de microglía primaria donde la expresión de *Foxo3a* había sido interferida, el nivel de expresión del ARNm de algunos de los genes contenidos en la IFN- $\beta$ S. Se observó que al tratar la microglía con el ARNi de *Foxo3a* se produjo un incremento estadísticamente significativo de la expresión de los genes *Irf7*, *Rsad2*, *Ifit2*, *Oasl1*, *Zbp1*, *Ifi44*, *Usp11*, *Oas1a*, *Oas2*, *Oasl2*, *Oas1g* y una tendencia al aumento en el caso de los genes *Ddx58* e *Ifit1* (Figura 41).



**Figura 41. FOXO3 actúa como represor de los genes de la IFN- $\beta$ S en la microglía.** qRT-PCR de algunos genes contenidos en la IFN- $\beta$ S (*Irf7*, *Rsad2*, *Ifit2*, *Oasl1*, *Zbp1*, *Ifi44*, *Ddx58*, *Ifit1*, *Usp18*, *Oas1a*, *Oas2*, *Oasl2* y *Oas1g*) en muestras de cultivos primarios de microglía tratados con ARNi de *Sima* (control; C; barra gris) o ARNi de *Foxo3a* (ARNi; barra magenta) durante 4 horas. Se usó *Hmbs* como gen control. Se representa la media  $\pm$  error estándar de la media (u.r. unidades relativas). ( $n = 9-12$ ; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ; prueba  $t$  de Student para *Rsad2*, *Oasl1*, *Zbp1*, *Ifi44*, *Ddx58*, *Ifit1*, *Usp18*, *Oas1a*, *Oas2* y *Oasl2*; prueba Mann-Whitney para *Irf7*, *Ifit2* y *Oas1g*).

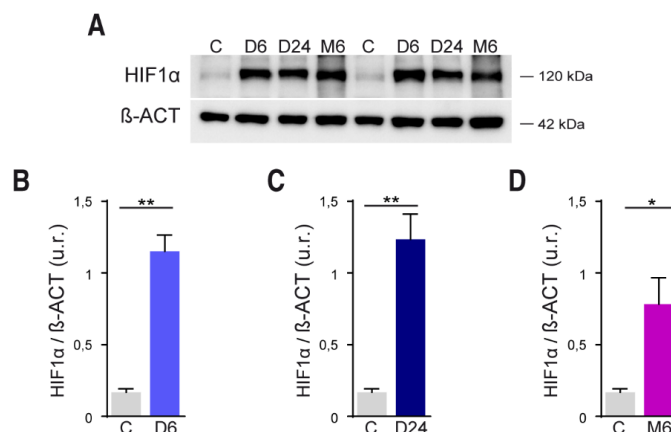
Además de conocerse que FOXO3 actúa como represor de la expresión de los genes implicados en la respuesta antiviral (Litvak et al., 2012), se ha demostrado que *Egln2*, gen que codifica para PHD1, regula la estabilidad de FOXO3 mediante hidroxilación, de manera que cuando FOXO3 es



## RESULTADOS

hidroxilado en dos residuos de prolina por acción de la PHD1, se disocia de la deubiquitinasa USP9x, se ubiquitina y se degrada (Zheng et al., 2014). Asimismo también se ha publicado que existe interacción entre PHD3 y FOXO3 (Rodríguez et al., 2016). Para estudiar si en las células microgliales la acción de las PHDs también afecta a la regulación de FOXO3 y si su degradación es vía proteasoma, se expusieron cultivos primarios de microglía de ratón a DMOG 0,1 mM durante 6 o 24 horas o a MG132 (un inhibidor del proteasoma) 10  $\mu$ M durante 6 horas.

Como se observó anteriormente, el tratamiento con DMOG provoca la estabilización de HIF1 $\alpha$  (Figura 14B), y además también está descrito que la degradación de HIF1 $\alpha$  se produce vía proteasoma (Tanimoto, 2000), por lo que para comprobar que los tratamientos habían funcionado correctamente en el cultivo primario de microglía, se midió el nivel de expresión de la proteína HIF1 $\alpha$  en las diferentes condiciones. Se observó que tanto cuando el cultivo es tratado con DMOG 0,1 mM durante 6 horas (Figuras 42A y 42B), como cuando es tratado con DMOG 0,1 mM durante 24 horas (Figuras 42A y 42C), así como cuando es tratado con MG132 10  $\mu$ M durante 6 horas (Figuras 42A y 42D), se produce un incremento de los niveles de expresión de la proteína HIF1 $\alpha$ .

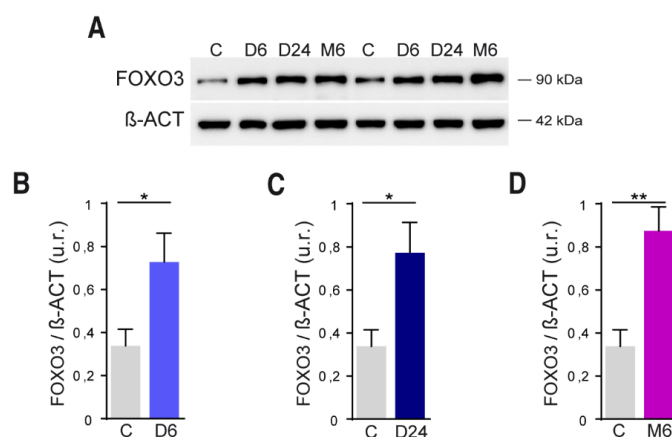


**Figura 42. La ausencia de hidroxilación y la inhibición del proteasoma provocan la estabilización de HIF1 $\alpha$  en la microglía.** WB y cuantificación del WB de muestras de cultivos primarios de microglía de ratón tratados con vehículo (C; barra gris), DMOG 0,1 mM 6 horas (D6; barra azul clara), DMOG 0,1 mM 24 horas (D24; barra azul oscura) o MG132 10  $\mu$ M 6 horas (M6; barra magenta). (A) Imágenes representativas de 2 experimentos independientes de WB para la proteína HIF1 $\alpha$  con  $\beta$ -ACTINA ( $\beta$ -ACT) como control de carga. (B) Cuantificación del WB descrito en A para las muestras tratadas con DMOG 0,1 mM durante 6 horas, usando medidas relativas a  $\beta$ -ACT. Se representa la media  $\pm$  error estándar de la media (u.r. unidades relativas). (n = 5; \*\* p < 0,01; prueba t de Student). (C) Cuantificación del WB descrito en A para las muestras tratadas con DMOG 0,1 mM durante 24 horas, usando medidas relativas a  $\beta$ -ACT. Se representa la media  $\pm$  error estándar de la media (u.r. unidades relativas). (n = 5; \*\* p < 0,01; prueba t de Student). (D) Cuantificación del WB descrito en A para las muestras tratadas con MG132 10  $\mu$ M durante 6 horas, usando medidas relativas a  $\beta$ -ACT. Se representa la media  $\pm$  error estándar de la media (u.r. unidades relativas). (n = 5; \* p < 0,05; prueba t de Student).



## RESULTADOS

Una vez comprobado que el tratamiento era el adecuado, se midieron los niveles de expresión de la proteína de FOXO3 en las diferentes condiciones de cultivo, observándose que tanto cuando el cultivo primario de microglía es expuesto a un tratamiento con DMOG 0,1 mM durante 6 horas (**Figuras 43A y 43B**), como cuando es expuesto a DMOG 0,1 mM durante 24 horas (**Figuras 43A y 43C**), así como cuando es expuesto a MG132 10  $\mu$ M durante 6 horas (**Figuras 43A y 43D**), se produce un incremento de los niveles de expresión de la proteína FOXO3.



**Figura 43. La ausencia de hidroxilación y la inhibición del proteasoma provocan la estabilización de FOXO3 en la microglía.** WB y cuantificación del WB de muestras de cultivos primarios de microglía de ratón tratados con vehículo (C; barra gris), DMOG 0,1 mM 6 horas (D6; barra azul clara), DMOG 0,1 mM 24 horas (D24; barra azul oscura) o MG132 10  $\mu$ M 6 horas (M6; barra magenta). **(A)** Imágenes representativas de 2 experimentos independientes de WB para la proteína FOXO3 con  $\beta$ -ACTINA ( $\beta$ -ACT) como control de carga. **(B)** Cuantificación del WB descrito en A para las muestras tratadas con DMOG 0,1 mM durante 6 horas, usando medidas relativas a  $\beta$ -ACT. Se representa la media  $\pm$  error estándar de la media (u.r. unidades relativas). ( $n = 5$ ; \*  $p < 0,05$ ; prueba  $t$  de Student). **(C)** Cuantificación del WB descrito en A para las muestras tratadas con DMOG 0,1 mM durante 24 horas, usando medidas relativas a  $\beta$ -ACT. Se representa la media  $\pm$  error estándar de la media (u.r. unidades relativas). ( $n = 5$ ; \*  $p < 0,05$ ; prueba  $t$  de Student). **(D)** Cuantificación del WB descrito en A para las muestras tratadas con MG132 10  $\mu$ M durante 6 horas, usando medidas relativas a  $\beta$ -ACT. Se representa la media  $\pm$  error estándar de la media (u.r. unidades relativas). ( $n = 5$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; prueba  $t$  de Student).

Estos datos muestran que en microglía FOXO3 regula la expresión de los genes de la IFN- $\beta$ S y que FOXO3 está regulado por las PHDs así como por el proteasoma.

Para estudiar si existe interacción entre FOXO3 y PHD3 y si existe, como está descrito para PHD1, hidroxilación en determinadas prolinas (P426 y P437) (Zheng et al., 2014), se realizaron estudios en células de riñón embrionario humano (HEK; del inglés, *human embryonic kidney*) 293T. Estas células fueron cotransfectadas con el plásmido pCMV6-FOXO3 (Myc-DDK tagged) (WT o con las mutaciones P426A/P437A) junto con el plásmido pCDNA3-PHD1 (V5 tagged) o pCDNA3-PHD3 (V5 tagged). Como control positivo se usó el plásmido pEF1-HIF1 $\alpha$  (DDK tagged), ya que se conoce que HIF1 interactúa tanto con PHD1 como con PHD3 (Cockman et al., 2019), y como control negativo se usó el vector vacío (EV; del inglés, *empty vector*) pEF1. La mitad de los

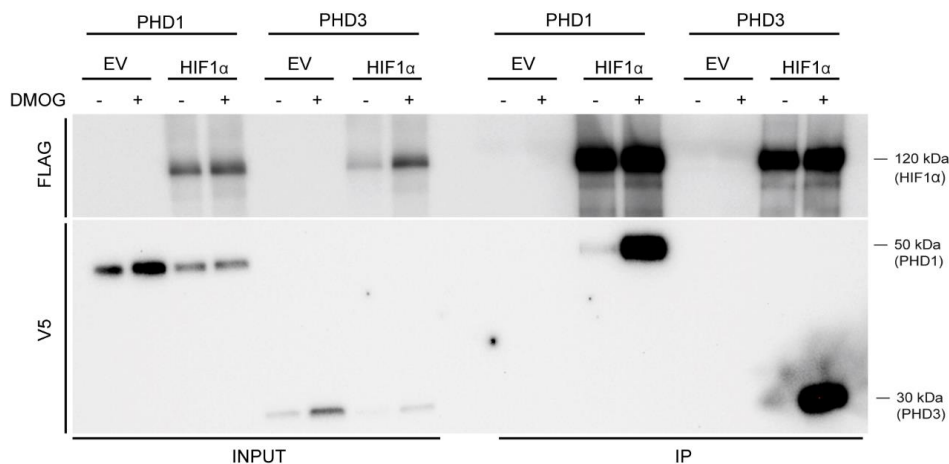




## RESULTADOS

cultivos fueron tratados con DMOG 1 mM durante 24 horas y se realizó inmunoprecipitación de proteínas usando perlas magnéticas anti-FLAG. Los resultados mostraron que en presencia de DMOG HIF1 interacciona tanto con PHD1 como con PHD3 (**Figura 44**), mientras que en FOXO3 solo se observa interacción con PHD3 y que esta interacción es independiente de las prolinas que habían sido mutadas (**Figura 45**).

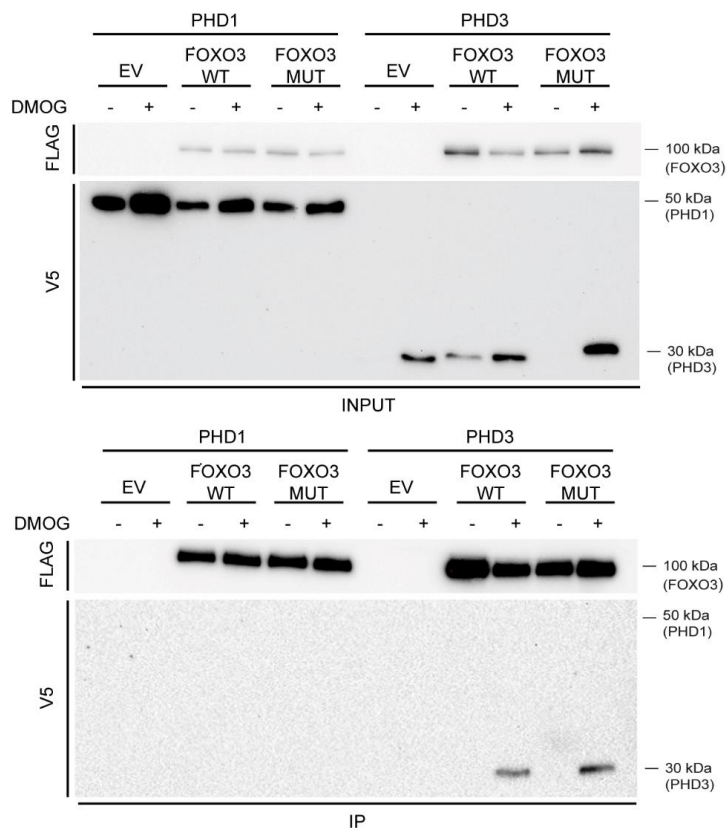
Una vez probada la interacción entre FOXO3 y PHD3, se realizaron de nuevo cotransfecciones en las células HEK-293T, se trataron las células en este caso con MG132 para inhibir el proteasoma y de nuevo se inmunoprecipitaron las proteínas con perlas magnéticas anti-FLAG. Como control positivo se usó el plásmido pEF1-HIF1 $\alpha$  (DDK *tagged*) y como control negativo el plásmido pCDNA3. Observamos que al inhibir el proteasoma la banda correspondiente a PHD3 en las muestras cotransfectadas con pCMV6-FOXO3 (Myc-DDK *tagged*) + pCDNA3-PHD3 (V5 *tagged*), es de menor intensidad y que aparece una banda a la altura de 120 kDa, por encima de la banda correspondiente a FOXO3 (**Figura 46A**). Para comprobar si esta banda corresponde con PHD3, se incubó la parte superior de la membrana con el anticuerpo V5, observando que aparece una banda, lo que sugiere que esa banda que se observa es PHD3 (**Figura 46B**). Estos datos fueron comprobados por espectrometría de masas de la banda aislada (datos no mostrados). Todo esto confirma la fuerte interacción existente entre PHD3 y FOXO3.



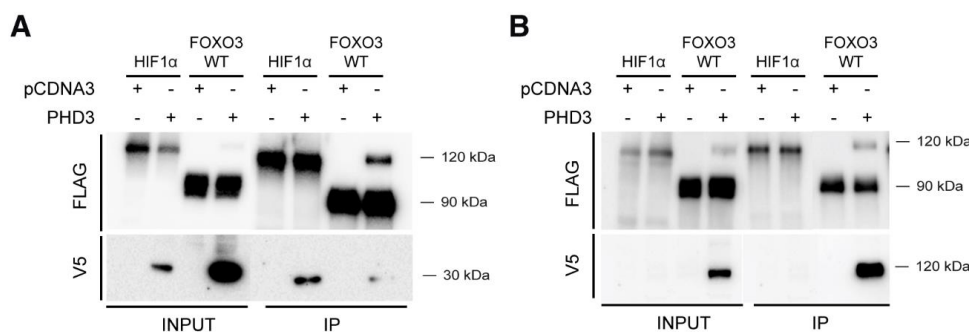
**Figura 44. HIF1 interacciona tanto con PHD1 como con PHD3 en las células HEK-293T en presencia de DMOG.** Imágenes representativas de WB de muestras de cultivos de células HEK-293T transfectadas con pEF1 (EV) o pEF1-HIF1 $\alpha$  (DDK *tagged*) (HIF1 $\alpha$ ) junto con pCDNA3-PHD1 (V5 *tagged*) (PHD1) o pCDNA3-PHD3 (V5 *tagged*) durante 4 horas antes del tratamiento con DMOG 1 mM durante 24 horas. El INPUT muestra los extractos celulares iniciales e IP el resultado tras inmunoprecipitar las proteínas con perlas magnéticas anti-FLAG ( $n = 2$ ).



## RESULTADOS



**Figura 45. FOXO3 interacciona con PHD3 pero no con PHD1 en las células HEK-293T en presencia de DMOG.** Imágenes representativas de WB de muestras de cultivos de células HEK-293T transfectadas con pEF1 (EV), pCMV6-FOXO3 (Myc-DDK tagged) WT (FOXO3 WT) o con las mutaciones P426A/P437A (FOXO3 MUT) junto con pCDNA3-PHD1 (V5 tagged) (PHD1) o pCDNA3-PHD3 (V5 tagged) (PHD3) durante 4 horas antes del tratamiento con DMOG 1 mM durante 24 horas. El INPUT muestra los extractos celulares iniciales e IP el resultado tras inmunoprecipitar las proteínas con perlas magnéticas anti-FLAG ( $n = 2$ ).



**Figura 46. Al inhibir el proteasoma se observa una fuerte interacción entre FOXO3 y PHD3 en células HEK-293T que no se rompe por tratamiento con SDS.** Imágenes representativas de WB de muestras de cultivos de células HEK-293T transfectadas con pEF1-HIF1α (DDK tagged) (HIF1α) o pCMV6-FOXO3 (Myc-DDK tagged) WT (FOXO3 WT) junto con pCDNA3 o pCDNA3-PHD3 (V5 tagged) (PHD3) durante 4 horas y posteriormente tratadas con MG132 12,5  $\mu$ M 4 horas y media. El INPUT muestra los extractos celulares iniciales



## RESULTADOS

e IP el resultado tras inmunoprecipitar las proteínas con perlas magnéticas anti-FLAG ( $n = 2$ ). **(A)** Parte superior de la membrana incubada con el anticuerpo anti-FLAG para detectar HIF1 $\alpha$  y FOXO3 y parte inferior de la membrana incubada con el anticuerpo anti-V5 para detectar PHD3. **(B)** Parte superior de la membrana incubada con el anticuerpo anti-FLAG para detectar HIF1 $\alpha$  y FOXO3 y con el anticuerpo anti-V5 para detectar si la banda superior observada al cotransfectar pCMV6-FOXO3 (Myc-DDK *tagged*) WT (FOXO3 WT) junto con pCDNA3-PHD3 (V5 *tagged*) (PHD3) corresponde a PHD3.

Estos resultados muestran que existe interacción entre FOXO3 y PHD3, que esta es dependiente del tratamiento con DMOG o de la inhibición del proteasoma y que la interacción observada al inhibir la degradación por el proteasoma es bastante fuerte, ya que no es capaz de romperse por el tratamiento con dodecil sulfato de sodio (SDS; del inglés, *sodium dodecyl sulfate*). Sin embargo, en ningún caso se pudo comprobar la presencia de actividad hidroxilasa de PHD3 sobre FOXO3 mediante espectrometría de masas (datos no mostrados).



## DISCUSIÓN

ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**000008745e2000018471**

CSV

**GEISER-8bff-daf6-0743-4697-b100-1dc0-5d4b-77e1**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular**



GEISER-8bff-daf6-0743-4697-b100-1dc0-5d4b-77e1

ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**000008745e2000018471**

CSV

**GEISER-8bff-daf6-0743-4697-b100-1dc0-5d4b-77e1**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular**



GEISER-8bff-daf6-0743-4697-b100-1dc0-5d4b-77e1

## 4. DISCUSIÓN

Desde su descubrimiento hace más de 100 años, se anticipó la complejidad de las células microgliales debido a la diversidad de formas que las caracterizaban (Río-Hortega, 1919). En pacientes con EA y en animales modelos, las células microgliales responden a la acumulación de A $\beta$  a través de la activación de diversos módulos funcionales que operan juntos para realizar varias acciones, que incluyen, entre otras, proliferación, agrupamiento, fagocitosis de A $\beta$ , respuestas relacionadas con IFN y producción de citoquinas inflamatorias (Deczkowska et al., 2018; Friedman et al., 2018). Inherente a la naturaleza de la microglía como células inmunes innatas, la activación de módulos funcionales relacionados con la EA es bastante inespecífica, ya que estos módulos también se encontraron en la microglía aislada de modelos animales de diferentes enfermedades o envejecimiento (Friedman et al., 2018; Holtman et al., 2015; Keren-Shaul et al., 2017; Krasemann et al., 2017). El papel de la DAM en la progresión de la EA está bajo debate, ya que tanto la estrategia para impulsar la DAM (Deczkowska et al., 2018; Keren-Shaul et al., 2017), así como la de recuperar la microglía homeostática (Krasemann et al., 2017) se han propuesto para tratar la enfermedad. Por lo tanto, es posible que se produzcan resultados positivos y negativos en respuesta a la acumulación de A $\beta$  por el mismo o diferente subconjunto de células microgliales. Nosotros hipotetizamos que la descomposición de la respuesta microglial en módulos individuales que podrían ajustarse de manera dependiente del contexto, podría ayudar a resolver este dilema. Además, aunque la identificación de módulos generales de la DAM es de potencial interés terapéutico, la presentación de módulos de expresión específicos de la microglía de EA podría optimizar los enfoques terapéuticos.

Para facilitar la comprensión, la discusión es presentada de acuerdo a los objetivos planteados.

### 4.1. OBJETIVO 1: HIF1 EN LA MICROGLÍA DE LA EA

Cada vez existen más evidencias que muestran que la actividad defensiva de las células microgliales es necesaria para detener la progresión de la EA (Condello et al., 2015; Leyns et al., 2019; Wang et al., 2016; Yuan et al., 2016). Por lo tanto, entender cómo estas células son capaces de sobrevivir y proporcionar una respuesta completa bajo las condiciones que se encuentran en la patología cerebral, es de suma importancia.

Está descrito que la función de la microglía es contener la expansión de las placas de A $\beta$  y proteger a las neuronas de la toxicidad local asociada a estas (Condello et al., 2015), ya que se agrupan y sitúan alrededor de las placas de A $\beta$ , constituyendo la primera barrera de defensa. Las



## DISCUSIÓN

células microgliales tienen un profundo impacto en la composición de la placa y en su toxicidad, encontrándose un menor número de neuritas distróficas en aquellas regiones de las placas que están cubiertas por la microglía (Condello et al., 2015), dato que también se observó en experimentos anteriores realizados en el laboratorio, donde la exposición a hipoxia redujo la población microglial alrededor de las placas amiloides e incrementó el número de neuritas distróficas (Heras-Garvín, 2015).

En el área que rodea a las placas de A $\beta$  encontramos hipoxia y una reducción de la perfusión sanguínea. Esto podría estar provocado por la respuesta defensiva crónica ejercida por las células inmunes agrupadas alrededor de las placas, ya que consumen una elevada cantidad de O<sub>2</sub> para cumplir con el costo energético defensivo y biosintético (Eltzschig & Carmeliet, 2011) y además producen una alteración local de los vasos sanguíneos que afecta a su perfusión, morfología y función vascular (De Bock et al., 2009). Tanto en cerebros humanos de pacientes con EA como en modelos animales, se observa una profunda alteración de la microvasculatura en las proximidades de las placas amiloides (Kalaria, 1997; Kawai et al., 1990, 1992; Kouznetsova et al., 2006; Lee et al., 2005; Meyer et al., 2008; Sengillo et al., 2013; Sweeney et al., 2018), lo que sugiere que las células que rodean a las placas de A $\beta$  podrían estar bajo estrés de O<sub>2</sub> y nutrientes.

Además, recientes estudios epidemiológicos, clínicos, patológicos y experimentales asocian la EA no solo con la acumulación de A $\beta$ , la patología de TAU y la pérdida neuronal, sino que también con una disfunción neurovascular temprana que contribuye a la patogénesis de la enfermedad (Arvanitakis et al., 2006; Iadecola, 2004, 2013; Iturria-Medina et al., 2016; Montagne et al., 2015; Nelson et al., 2016; Sweeney et al., 2015; Toledo et al., 2013). Se ha estimado que la disfunción de los vasos sanguíneos del cerebro contribuye total o parcialmente a aproximadamente el 40% de todas las demencias a nivel mundial, incluida la EA (Iadecola, 2013; Hachinski, 2015; Montine et al., 2014; Snyder et al., 2015; Wardlaw et al., 2013). Estos cambios en la vasculatura cerebral de inicio temprano y progresivos, finalmente conducen a una disminución del flujo sanguíneo cerebral y a un deterioro de la hiperemia funcional, es decir, de la capacidad del flujo sanguíneo local para aumentar en respuesta a la activación neuronal (Petzold & Murthy, 2011).

Hemos observado que el área que rodea a las placas de A $\beta$  está hipóxica e hipoperfundida y que la A $\beta$ AM tenía incrementado los niveles de expresión de *Hif1a*, un conocido modulador de la función inmune innata (Eltzschig & Carmeliet, 2011; O'Neill & Pearce, 2016) y esencial en los procesos mediados por la hipoxia (Harris et al., 2014). Se definió la HMS y se comprobó que la expresión de los genes contenidos en la HMS se regulaba a través de HIF1, pues cuando eliminamos *Hif1a* de manera condicional a través del tratamiento con TMX, ni siquiera el tratamiento con DMOG consiguió estabilizar la expresión de HIF1 $\alpha$  a nivel de proteína, lo que se tradujo en una disminución de la expresión de los genes de la HMS. Esto lo observamos no solo en





la microglía de cultivos primarios, sino también en las células de microglía aisladas de modelos de EA, en las que la expresión tanto de *Hif1a* como de los genes incluidos en la HMS estaba incrementada en aquellos animales que acumulan A $\beta$  con respecto a los WT, debido al incremento de hipoxia e hipoperfusión, y esta expresión se vio disminuida al eliminar *Hif1a* mediante el tratamiento con TMX.

Los niveles de expresión del ARNm de *Hif1a* están incrementados en la microglía de diferentes modelos murinos que depositan A $\beta$  como son *APP-PSEN1* (Orre et al., 2014a; este trabajo), *5xfAD* (Keren-Shaul et al., 2017; Krasemann et al., 2017; Ulland et al., 2017; Wang et al., 2015), *APP23* (Wendeln et al., 2018), *APP<sup>NL-G-F</sup>* (Sala-Frigerio et al., 2019) y *APP751SL* (este trabajo), así como en la DAM de otros modelos como son el de ELA (*SOD1p.G93A*; Krasemann et al., 2017) y *MAPTp.P301S* (este trabajo), y en el cerebro de pacientes con EA (**Figura 6**) (Heras-Garvín, 2015). Por lo tanto, la inducción del ARNm de *HIF1a* observada tanto en muestras de cerebros humanos de pacientes con EA, así como en la DAM de diferentes modelos murinos, es probablemente la suma de múltiples factores, incluyendo la inflamación local (Eltzschig & Carmeliet, 2011) y la inducción de mTOR a través de TREM2 (Ulland et al., 2017), que también regula la transcripción de *Hif1a* (Land & Tee, 2007). Interesantemente, STAT3, identificado aquí como candidato para la regulación de la transcripción de la A $\beta$ AM, es requerido para la inducción transcripcional de *Hif1a* a través de mTOR. Bajo condiciones de hipoxia, mTOR fosforila a STAT3 en un residuo de serina y promueve la transcripción de *Hif1a* (Dodd et al., 2015).

En contraste con la expresión del ARNm de *Hif1a* que se encontró incrementada en diferentes modelos de DAM, la HMS estaba inequívocamente más enriquecida en la A $\beta$ AM que en cualquier otra DAM, como se demostró en la comparación de la microglía activada (CLEC7a+) aislada de dos modelos de ratón, *APP751SL* y *MAPTp.P301S*, y mediante el re-análisis de conjuntos de datos transcriptómicos publicados previamente. Observamos que el GS "HMS" era la principal diferencia entre la microglía de A $\beta$  *APP751SL* con respecto a TAU *MAPTp.P301S*, ya que en ambos modelos, así como en el resto de modelos re-analizados, el GS "MGnD", típico de la DAM, estaba incrementado (Deczkowska et al., 2018; Lucin & Wyss-Coray, 2009).

Los niveles de proteína de HIF1 $\alpha$  así como su actividad transcripcional, están estrictamente regulados por mecanismos traduccionales y postraduccionales que incluyen una mayor eficiencia de la traducción (Dodd et al., 2015; Kaelin & Ratcliffe, 2008; Majmundar et al., 2010), hidroxilación dependiente de O<sub>2</sub> por parte de las PHDs y el FIH (Kaelin & Ratcliffe, 2008) y desacetilación por sirtuinas dependientes del estado energético (Majmundar et al., 2010), lo que sugiere que la activación de la HMS encontrada de forma específica en la A $\beta$ AM, es una suma del incremento de la transcripción del ARNm de *Hif1a* que encontramos en la DAM, así como de la hipoxia local e hipoperfusión encontrada alrededor de las placas de A $\beta$ .



## DISCUSIÓN

El enriquecimiento de la transcripción mediada por HIF1, encaja bien con la propuesta de que en la AβAM la glucólisis está incrementada (Ulland et al., 2017; Wendeln et al., 2018), pero sin embargo contradice los hallazgos realizados por Baik y colaboradores, que predijeron una menor actividad glucolítica en estas células (Baik et al., 2019). Algunos de estos trabajos anteriores suponen que la inducción de HIF1 a través de TREM2/mTOR (Ulland et al., 2017) está cambiando el metabolismo de la AβAM de un metabolismo oxidativo basal, a un metabolismo glucolítico anaerobio protector, que se exagera hacia un resultado negativo por el tratamiento sistémico con LPS (Wendeln et al., 2018); o que la AβAM que primariamente cambia su metabolismo de oxidativo hacia glucolítico anaerobio, entra finalmente en un estado inmune tolerante que exhibe defectos en el metabolismo celular, lo que implica tanto defectos en la glucólisis anaerobia como en la OXPHOS (Baik et al., 2019).

Aunque la glucólisis es menos eficiente en la producción de ATP con respecto a la respiración mitocondrial, el metabolismo de la glucosa en la glucólisis es de 10 a 100 veces más rápido que en la OXPHOS, permitiendo cumplir procesos que requieren intensa energía (Baik et al., 2019). Sin embargo, sorprendentemente y en contraposición a los trabajos mencionados anteriormente, nosotros encontramos que el incremento de expresión de *Hif1a* era paralelo a la activación de la expresión de genes implicados en la OXPHOS en la DAM de diferentes modelos murinos de neurodegeneración. También se observó en la AβAM un alto contenido mitocondrial asociado a una expansión en el retículo endoplásmico rugoso, lo que sugiere que las mitocondrias están generando, al menos parcialmente, la energía y los componentes necesarios para la síntesis de proteínas, y otros compuestos.

Por qué las células microgliales de modelos murinos de neurodegeneración eligen emplear un metabolismo oxidativo en lugar de un metabolismo glucolítico anaerobio, es por el momento desconocido. Estudios en cáncer han propuesto que el cambio de metabolismo oxidativo a glucolítico anaerobio, es relevante en etapas tempranas del crecimiento tumoral, ya que facilita la proliferación celular en un medio rico en O<sub>2</sub> y nutrientes. Similar a las células tumorales, la microglía puede responder inicialmente a la deposición de Aβ mediante una adaptación metabólica mediada por glucólisis anaerobia que hace que la microglía adopte un fenotipo fagocítico (Baik et al., 2019; Weichhart et al., 2015). Este cambio metabólico ha sido asociado con un estado pro-inflamatorio en macrófagos (Diskin & Pålsson-McDermott, 2018) y que podría contribuir con consecuencias perjudiciales para la enfermedad (Heneka et al., 2015). Bajo restricción de nutrientes, las células tumorales reprograman su metabolismo, pasando de un metabolismo glucolítico anaerobio a un metabolismo oxidativo, para poder superar el estrés energético (Li et al., 2017). Nosotros especulamos que una reprogramación metabólica similar está teniendo lugar en la AβAM, debido a las peculiares características de los vasos sanguíneos



que encontramos en las inmediaciones de las placas de A $\beta$ , con una baja perfusión, y a la alta actividad metabólica de las células inmunes que encontramos agrupadas. La coexistencia de un metabolismo de la glucosa mediado por HIF1 con una elevada OXPHOS, es una adaptación extrema al estrés nutricional, y que se consigue por la elongación de la mitocondria tanto en células no transformadas (Gomes et al., 2011; Rambold et al., 2011) como en células tumorales (Li et al., 2017).

Cada vez son más las evidencias que revelan que la morfología específica de la mitocondria se asocia con el estado energético y la supervivencia celular. Una serie de estudios han indicado que las mitocondrias juegan un papel integral crítico en la adaptación rápida a condiciones de nutrientes variables y a la demanda bioenergética al cambiar su dinámica de fusión y fisión. Las células expuestas a un ambiente rico en nutrientes tienden a mantener sus mitocondrias en un estado separado (fragmentado), mientras que las mitocondrias en las células que están bajo estrés nutricional están conectadas (elongadas) (Gomes et al., 2011; Molina et al., 2009). La formación de redes mitocondriales interconectadas –elongación mitocondrial– protege a estos orgánulos de la mitofagia y maximiza el funcionamiento del ciclo de los ácidos tricarboxílicos para la biosíntesis y producción de ATP, manteniendo de esta manera la viabilidad celular bajo condiciones de privación de O<sub>2</sub> y nutrientes (Gomes et al., 2011; Li et al., 2017; Rambold et al., 2011).

Cómo la elongación mitocondrial induce el cambio metabólico de glucólisis anaerobia a OXPHOS durante el estrés energético, aún no está claro. La elongación de la mitocondria inducida por el estrés energético facilita la formación de crestas y el ensamblaje de complejos respiratorios para mejorar la OXPHOS, lo que a su vez exhibe un efecto inhibitorio sobre la glucólisis a través de la activación de las sirtuinas (Li et al., 2017), cuya actividad es dependiente de los niveles intracelulares de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD<sup>+</sup>) (Imai & Guarente, 2014; Verdin, 2014). Las sirtuinas pueden desacetilar una variedad de sustratos bajo diferentes condiciones, y por lo tanto están implicadas en un amplio rango de condiciones fisiológicas, incluyendo el control del metabolismo (Rahman & Islam, 2011). Lim y colaboradores demostraron que las sirtuinas, específicamente la sirtuina 1 (SIRT1), se une a HIF1 $\alpha$  y provoca la desacetilación de un residuo de lisina, inhibiendo la glucólisis anaerobia (Lim et al., 2010). Esta inhibición de la glucólisis anaerobia tiene lugar porque la desacetilación de HIF1 $\alpha$  hace que éste se inactive, ya que se bloquea la unión con el coactivador transcripcional p300; en consecuencia, se reprime la expresión de sus genes dianas, disminuyendo así la expresión de *Pdk1* (Yoon et al., 2014), lo que facilita la conversión del piruvato en acetil-coenzima A, y favorece la función mitocondrial (Li et al., 2017).

En este trabajo se observó que en la A $\beta$ AM de dos modelos diferentes que acumulan A $\beta$  (*APP-PSEN1* y *APP<sub>751SL</sub>*), el ARNm de *Pdk1* no estaba inducido, a pesar de la inducción de muchos otros



## DISCUSIÓN

genes regulados por HIF1. Por lo tanto, es tentador especular que la actividad de las sirtuinas podría estar permitiendo a la A $\beta$ AM oxidar la glucosa en la mitocondria para adaptarse a la situación de hipoxia e hipoperfusión. De acuerdo con esto observamos que, cuando HIF1 estaba sobre-estabilizado por la hipoxia genética –deficiencia de *Vhl* en la microglía adulta–, se inducía la expresión de *Pdk1* en la A $\beta$ AM y se reducía la expresión de los mensajeros codificantes de proteínas de la OXPHOS, lo que se asoció con disfunción microglial, ya que observamos una disminución en el número de células microgliales, así como en la microglía que se sitúa alrededor de las placas de A $\beta$ , lo que subraya la importancia de la OXPHOS en la A $\beta$ AM para su correcto funcionamiento y supervivencia celular.

Proponemos, por tanto, que esta situación en la que encontramos un incremento de la OXPHOS en combinación con la expresión génica medida por HIF1, es una peculiaridad del metabolismo de la A $\beta$ AM, que se da por las características especiales del parénquima local donde encontramos hipoxia e hipoperfusión, mientras que la OXPHOS es una característica común a la microglía asociada al trastorno neurodegenerativo. Además, también observamos que cuando la microglía primaria era expuesta únicamente a condiciones de hipoxia, donde no encontraba restricción de nutrientes a diferencia de la A $\beta$ AM, el comportamiento era diferente. La restricción exclusiva de O<sub>2</sub> hace que el metabolismo de estas células sea glucolítico, encontrándose la OXPHOS disminuida, lo que se pudo observar tanto por estudios de GSEA como por experimentos de *Seahorse* donde medimos tanto la respiración mitocondrial como la extrusión de protones al espacio extracelular. Esto concuerda con el incremento observado en la expresión del ARNm de la enzima *Pdk1*, lo que hace que se inhiba la entrada del piruvato en la mitocondria, impidiendo de esta manera que se pueda llevar a cabo la OXPHOS. Además, bajo condiciones de hipoxia, la disminución de los niveles de NAD<sup>+</sup> podrían provocar la disminución de la expresión de la SIRT1, lo que permitiría la acetilación y activación de HIF1 $\alpha$  (Lim et al., 2010).

Aunque la activación de HIF1 probablemente contribuya a la adaptación metabólica de la A $\beta$ AM, también las hace más vulnerables, ya que la vía de HIF regula el control mediado por mTOR de la actividad mitocondrial (Weichhart et al., 2015). Esta regulación se ejerce no solo activando PDK1, sino también transcribiendo *Redd1* (Brugarolas et al., 2004) y *Bnip3* (Li et al., 2007), dos genes que están incluidos en la HMS y que tienen incrementada su expresión en la A $\beta$ AM. Por lo tanto, los estímulos sistémicos que puedan incrementar HIF1 en la microglía podrían alterar su estado metabólico y causar disfunción, similar a los defectos en el agrupamiento observados en la A $\beta$ AM expuesta a hipoxia genética. De acuerdo con esto, la activación excesiva de HIF1 en microglía por inyección sistémica de LPS también resultó en glucólisis anaeróbica, producción de citoquinas pro-inflamatorias y empeoramiento de la neuropatología de la EA (Wendeln et al., 2018). Inversamente, tanto el rutósido sódico, un flavonoide natural que induce un cambio



metabólico en la microglía de glucólisis anaeróbica a OXPHOS (Pan et al., 2019), e IFN $\gamma$ , un inductor de mTOR (Kroczynska et al., 2016), atenuaron la neuroinflamación (Pan et al., 2019), y disminuyeron los defectos de aprendizaje y memoria observados en modelos de deposición de A $\beta$  (Baik et al., 2019; Pan et al., 2019).

## 4.2. OBJETIVO 2: PHD3 EN LA MICROGLÍA DE LA EA

Estudios previos llevados a cabo en el laboratorio mostraron que la ausencia de PHD3, proteína codificada por el gen *Egln3*, en el modelo murino de la EA que deposita A $\beta$  *APP-PSEN1*, producía una mejora de la patología asociada a esta enfermedad. En estos animales, la ausencia de *Egln3* produjo una disminución de los niveles de A $\beta$ , un incremento del número de células microgliales asociadas a las placas de A $\beta$ , una disminución del número de neuritas distróficas asociadas a las placas amiloides, así como una reducción de la hiperactividad y una mejora de la memoria a corto plazo, que se encuentran alterados en los modelos murinos de la EA (Sánchez-García, 2018).

*Egln3* es un gen que en la microglía homeostática tiene una baja expresión tal y como han mostrado estudios de secuenciación de ARN de célula única realizados en áreas de corteza somatosensorial e hipocampo CA1 de ratón (Zeisel et al., 2015). Sin embargo, en la microglía de modelos murinos de la EA que acumulan A $\beta$ , *Egln3* es uno de los genes que más incrementada tiene su expresión (Orre et al., 2014a), y en este trabajo se muestra cómo esa expresión está prácticamente restringida a la A $\beta$ AM.

*Egln3* es una diana de HIF bien establecida (Metzen et al., 2003), cuya expresión además se ha comprobado que tanto en animales WT como en animales modelos de la EA está regulada por HIF1. La elevada expresión de *Hif1a* observada también de manera exclusiva en la A $\beta$ AM, concuerda con que en estas células también esté aumentada la expresión de *Egln3*.

Para conocer cuáles son los mecanismos moleculares que están implicados en los cambios observados en los estudios llevados a cabo previamente en el laboratorio al eliminar *Egln3* (Sánchez-García, 2018), se realizaron estudios de transcriptómica y GSEA en la microglía aislada mediante FACS de los modelos de EA *APP-PSEN1* y *Egln3*<sup>-/-</sup>; *APP-PSEN1*. Puesto que PHD3 está implicada en la hidroxilación y regulación de HIF1 $\alpha$  (Kaelin, 2005), uno de los cambios esperados al eliminar *Egln3* era el incremento de expresión de *Hif1a* y por lo tanto también de la HMS. Sin embargo, ni la expresión de *Hif1a* ni la de la HMS se vio incrementada, así como tampoco se observó un aumento de expresión en los genes *Egln1* o *Egln2* como mecanismo compensatorio por la falta de *Egln3*. De manera similar a lo que observamos en la microglía, en estudios realizados en neutrófilos, la eliminación de *Egln3* no produce incremento de la expresión de HIF1 $\alpha$  o HIF2 $\alpha$  ni de sus genes dianas (Swain et al., 2014; Walmsley et al., 2011), mientras que, sin embargo, en



## DISCUSIÓN

macrófagos, la deficiencia de PHD3 produce una potenciación de la estabilidad de la proteína HIF1 $\alpha$  (Kiss et al., 2012). Estos datos nos indican que los mecanismos de compensación aparecen de forma dependiente del contexto, ya que no siempre se observan. Además, estos resultados también apuntan a que PHD3 puede regular la expresión de genes de manera independiente a la regulación que se da a través de la vía de HIF (Lee et al., 2005; Walmsley et al., 2011; Zhang et al., 2009).

El estudio de los cambios transcripcionales en la microglía aislada del modelo murino de la EA *APP-PSEN1* al eliminar *Egln3*, mostró un incremento del GS "MGnD" característico de la DAM, así como de genes que ya se encontraban aumentados en la microglía del modelo murino *APP-PSEN1* con respecto a la microglía procedente de animales WT (Orre et al., 2014a), lo que apunta a una potenciación del perfil transcripcional de la microglía ya presente en *APP-PSEN1*. Además, también se observó en la microglía del modelo de EA *APP-PSEN1*, un incremento de la expresión del gen *Cd33*. Este gen está considerado un factor de riesgo para la EA, habiendo estudios que muestran que su presencia es tanto requerida como suficiente para inhibir la absorción por parte de la microglía del péptido A $\beta$ <sub>42</sub>, lo que limita su eliminación, mientras que la falta de expresión de *Cd33*, exhibe una marcada reducción de la insolubilidad del péptido A $\beta$ <sub>42</sub> y de la carga de placa, lo que indica que CD33 promueve la patología de A $\beta$  (Griciuc et al., 2013). La eliminación de *Egln3* en el modelo de EA *APP-PSEN1*, mostró una disminución de su expresión, lo que concuerda con los resultados previamente obtenidos en el laboratorio que muestran un incremento de la fagocitosis de la microglía al eliminar *Egln3*, así como una disminución de los niveles de A $\beta$  (Sánchez-García, 2018).

Diversos estudios muestran la implicación de PHD3 en la regulación del metabolismo (German et al., 2016; Miikkuinen et al., 2017; Taniguchi et al., 2013) y hemos comprobado que la eliminación de *Egln3* en el modelo *APP-PSEN1* produce un profundo ajuste en el metabolismo de la microglía. Observamos que se producen cambios en el metabolismo de ciertos aminoácidos, así como en la señalización PPAR implicada en el metabolismo de los lípidos y también se observan cambios en los genes que regulan la glucólisis. Estudiando los cambios que se producen observamos que, el incremento de expresión de los genes implicados en los diferentes procesos, dan lugar a intermediarios de las distintas rutas estudiadas que las células pueden emplear tanto para biosíntesis como para biodegradación. Está descrito que la actividad de PHD3 regula el metabolismo de los ácidos grasos, y que en condiciones de abundancia de nutrientes produce la hidroxilación y activación de la enzima acetil-coenzima A carboxilasa 2 (ACC2) (German et al., 2016), de manera que genera malonil-coenzima A para inhibir a la proteína transportadora de ácidos grasos carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1), suprimiendo de esta manera la oxidación mitocondrial de ácidos grasos (Brownsey et al., 2006). Sin embargo, otros estudios muestran un





papel contrario, siendo la eliminación de *Egln3* junto con *Egln2* y/o *Egln1* en hepatocitos la que produce la disminución de la expresión de CPT1, y en consecuencia la disminución de la  $\beta$ -oxidación mitocondrial (Taniguchi et al., 2013). Nosotros observamos mediante GSEA que la eliminación de *Egln3* incrementa la expresión del GS "*PPAR Signaling Pathway*" dentro del cual encontramos el gen *Cpt1*, pero si nos centramos en los datos de transcriptómica no observamos un incremento de la expresión de este gen, mientras que sí se produce aumento de la expresión del gen que codifica para ACC2. En cuanto a la glucólisis Kikuchi y colaboradores mostraron que PHD3 interacciona con la enzima piruvato deshidrogenasa (PDH), enzima que cataliza la conversión del piruvato en acetil-coenzima A y permite la entrada en el ciclo de Krebs. La falta de PHD3 provoca una disminución de la actividad de esta enzima (Kikuchi et al., 2014), lo que provocaría un incremento de la glucólisis anaeróbica. Sin embargo, estudios realizados en células de carcinoma renal muestran que el silenciamiento de *Egln3* produce una disminución de la glucólisis anaeróbica, observada por la disminución de la expresión de diversos genes implicados en dicho proceso, así como un incremento de la expresión de genes relacionados con el ciclo de Krebs, además de observarse un incremento de la tasa de consumo de  $O_2$  mediante ensayos de *Seahorse* (Miikkulainen et al., 2017). Estos datos indican que son necesarios más estudios para comprender la función que tiene PHD3 a nivel de metabolismo en las células de la microglía en la EA, y poder conocer cómo se está produciendo toda esta regulación, que seguramente será muy dependiente del microambiente en el que se encuentran estas células. En vista a los resultados obtenidos en el objetivo 1 de esta tesis, esta regulación del metabolismo será determinante para que la microglía ejerza de manera correcta su función.

Además de los cambios metabólicos también se observó en la microglía una fuerte disminución de la expresión de diferentes módulos implicados en la respuesta antimicrobiana cuando en el modelo murino *APP-PSEN1* se elimina *Egln3*. PHD3 no se ha relacionado previamente con respuestas antimicrobianas, pero se ha observado que su expresión, aunque se da en ciertos macrófagos bajo condiciones homeostáticas, está incrementada bajo condiciones inflamatorias, como en los macrófagos de pacientes que sufren la enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa (Escribese et al., 2012). Además, en modelos de ratón de lesión pulmonar aguda y colitis ulcerosa se ha observado que la deficiencia de PHD3 reduce la supervivencia de los neutrófilos a través del incremento de su apoptosis, lo que se relaciona con una mejor resolución de la inflamación, ocurriendo todo ello de manera independiente de HIF1 (Walmsley et al., 2011). Sin embargo, otros estudios muestran que, en modelos murinos de sepsis, la deficiencia de PHD3 agrava el curso clínico de la enfermedad, observándose una respuesta inmune innata hiperactivada que conduce a una estabilización robusta de diversas funciones pro-inflamatorias de macrófagos que aumenta la letalidad de los animales, teniendo todo ello lugar de forma dependiente de HIF1 (Kiss et al., 2012).





## DISCUSIÓN

Aquí observamos que en la microglía del modelo de EA *APP-PSEN1*, se produjo una fuerte represión de los genes de respuesta a IFN- $\beta$ , que controlan la actividad antiviral, cuando eliminamos *Egln3*, además de una disminución de la expresión del gen *Ifnb1*, que codifica para IFN- $\beta$ . El módulo transcripcional relacionado con la respuesta a IFN ha sido recientemente descrito como característico de la microglía de la EA (Friedman et al., 2018) y en los estudios realizados se pudo comprobar la fuerte inducción de este módulo en la microglía de dos modelos de la EA diferentes que depositan A $\beta$ , *APP-PSEN1* (Orre et al., 2014a) y *5xfAD* (Wang et al., 2015). Los IFNs tipo I (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ) son reguladores de la inmunidad innata y han sido implicados en múltiples trastornos del SNC, aunque su papel en la progresión de la EA aún no ha sido investigado por completo (Minter et al., 2016). Hay estudios que muestran que la producción de IFN tipo I y sus mediadores de señalización aguas abajo, están incrementados en los cerebros del modelo de la EA *APP-PSEN1*, así como en muestras de cerebros humanos *post mortem* de pacientes con EA y en cultivos primarios de neuronas de ratón tratados con A $\beta$ . Estos estudios respaldan el papel del IFN-I en la respuesta pro-inflamatoria y en la muerte neuronal en la EA, y sugieren que el bloqueo de la señalización mediada por el IFN pueda ser un objetivo terapéutico para limitar la progresión de la EA, ya que al inhibir la cascada de señalización de IFN-I se observa una disminución de la apoptosis celular y de la neurotoxicidad del péptido A $\beta_{42}$  (Taylor et al., 2014). Otros estudios muestran que la inhibición de la señalización de IFN-I, a través de la eliminación de sus receptores, produce un rescate parcial del aprendizaje espacial y de las alteraciones de la memoria en modelos murinos de EA, además de desplazar el fenotipo microglial de pro-inflamatorio hacia un fenotipo antiinflamatorio, presumiblemente neuroprotector. Estos estudios además muestran que la inhibición de la señalización del IFN-I disminuye los niveles de expresión de CD33, así como aumenta los del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ; del inglés, *transforming growth factor*  $\beta$ ) (Minter et al., 2016). Esto concuerda con los datos obtenidos, ya que al eliminar *Egln3* en el modelo murino *APP-PSEN1*, se observó una disminución de la expresión de la IFN- $\beta$ S, que podría ser la responsable de la disminución de las neuritas distróficas asociadas a las placas y por lo tanto de la disminución de la neurotoxicidad y de la mejora de la capacidad cognitiva que muestran los experimentos anteriormente llevados a cabo en nuestro laboratorio (Sánchez-García, 2018), así como de la disminución de la expresión de *Cd33* observada, lo que muestra una relación entre la disminución de la expresión de los genes de respuesta a IFN y el daño asociado a las placas.

Además también se ha descrito en macrófagos que la respuesta a IFN-I produce un cambio en el metabolismo lipídico, produciendo una disminución de la biosíntesis de colesterol y un incremento de su importación (York et al., 2015). Observamos en nuestro modelo que al eliminar *Egln3* y disminuir de esta manera la respuesta a IFN-I, se produce también un cambio metabólico, en el que como hemos visto anteriormente los lípidos están implicados. Por lo tanto, conocer con



exactitud qué está sucediente en el metabolismo de estas células es clave para determinar si en la microglía los cambios observados en la respuesta a IFN están ocasionados por un cambio en su metabolismo.

La expresión de IRF7 es requerida para la producción de IFN-I (Honda et al., 2005). En los animales modelos de la EA la expresión de IRF7 está incrementada en comparación con animales WT lo que conlleva a una elevada capacidad para la producción de IFN-I, sin embargo, esta expresión está disminuida al interferir la señalización de IFN-I (Minter et al., 2016). De igual manera nuestros análisis mostraron que la expresión de *Irf7* se encontraba disminuida en la microglía de los animales *Egln3*<sup>-/-</sup>; *APP-PSEN1*, lo que impide la inducción de la expresión de *Ifnb1* y en consecuencia de los genes que regula.

A pesar de que la expresión de *Egln3* solo se observó en la microglía y no se esperan cambios en el resto de células al eliminar dicho gen, decidimos eliminarlo específicamente en la microglía adulta de manera condicional tanto en ratones WT como en el modelo murino de la EA *APP-PSEN1*, para estudiar si los cambios transcripcionales que habían sido observados previamente al eliminar *Egln3* en todas las células del organismo, se observaban al eliminar *Egln3* de manera específica en la microglía adulta. Tanto en animales WT como en animales *APP-PSEN1*, disminuyeron los niveles de expresión de *Egln3* en la microglía adulta, aunque cabe destacar que la eliminación no es total, puesto que se sigue observando expresión.

Diferentes estudios muestran papeles opuestos para PHD3 en cuanto a la supervivencia de células del sistema inmune innato. Walmsley y colaboradores mostraron que la presencia de PHD3 alarga la supervivencia de neutrófilos, lo que resulta en un retardo de la resolución de la inflamación (Walmsley et al., 2011), mientras que otros estudios muestran que en macrófagos es la ausencia de PHD3 la que inhibe la apoptosis de las células en situaciones de privación de suero (Swain et al., 2014). Esto indica que el papel de PHD3 en cuanto a la supervivencia celular es específico de cada tipo celular. Está descrito que la capacidad proliferativa de la microglía aumenta en modelos de EA que acumulan A $\beta$  (Kamphuis et al., 2012). En nuestras muestras de microglía aislada la presencia de A $\beta$  aumentó el número de la población microglial, así como su polarización hacia CD45, pero la eliminación de *Egln3* en la microglía adulta no afectó a ninguno de estos parámetros, lo que sugiere que en la microglía la ausencia de PHD3 no limita su capacidad, ni promueve la apoptosis, ya que no observamos disminución del número de células microgliales, aunque serían necesarios experimentos específicos para poder demostrarlo.

Al analizar si los cambios transcripcionales de los genes contenidos en la IFN- $\beta$ S que se observaron en la microglía de los animales *Egln3*<sup>-/-</sup>; *APP-PSEN1* con respecto a los animales *APP-PSEN1* también se producían al eliminar *Egln3* de manera específica en la microglía adulta



## DISCUSIÓN

(*Cx3cr1-Cre::ERT2; EglN3<sup>Flox/Flox</sup>; APP-PSEN1*), pudimos comprobar que su expresión también se veía disminuida. Sin embargo, la represión no fue tan fuerte como la observada cuando *EglN3* estaba eliminado desde el principio. Esta menor represión de los genes de la IFN- $\beta$ S puede explicarse por la expresión, aunque reducida, de *EglN3*, que podría estar inhibiendo esa disminución de la expresión de los genes de la IFN- $\beta$ S. Otra hipótesis que podría explicar esta menor disminución de la expresión, en relación con los resultados previos obtenidos en el laboratorio, es que la expresión que queda de *EglN3* no permita a la microglía estar tan cercana a la placa como cuando *EglN3* no está presente, y que esta cercanía a la placa sea necesaria para que se produzca la represión de estos genes, pero serían necesarios experimentos para comprobar cómo se encuentra la microglía en relación a la placa.

Al estudiar los cambios transcripcionales producidos centrándonos no solo en la microglía, sino de manera más general en la corteza, observamos mediante GSEA, que los GSs compuestos por los genes que aumentaban o disminuían su expresión en la microglía del modelo de EA *APP-PSEN1* al eliminar *EglN3*, se encontraban entre los que más cambian su expresión a nivel de corteza en los mismos animales. Sin embargo, al estudiar la expresión de algunos genes de manera específica mediante qRT-PCR para ver si pueden usarse como marcadores de lo que sucede en la microglía, se observó que los cambios que se producían en la microglía ya no se veían de forma tan clara en las muestras de corteza, siendo solo algunos de ellos válidos para poder usarse como marcadores genéticos. Esto puede deberse a que al analizar la corteza completa se miden no solo los cambios que se producen en las células microgliales, sino que se miden los cambios que se producen en todos los tipos celulares presentes en dicha muestra. Observamos mediante la técnica de ISH, que la expresión de *EglN3* estaba prácticamente restringida a la A $\beta$ AM, por lo que cabe esperar que aunque se elimine *EglN3* en todas las células, solo se produzcan cambios en las células de microglía, ya que en el resto no hay expresión de dicho gen. Al producirse los cambios de manera específica en la microglía, estos tienen que ser de gran magnitud, o de genes con expresión exclusiva en la microglía, para que seamos capaces de detectarlo mediante qRT-PPCR a nivel de corteza, ya que la expresión que se da en el resto de células puede estar apantallando los cambios producidos en la microglía.

La regulación de los genes de respuesta a IFN en macrófagos se produce por el factor de transcripción FOXO3, actuando este como un represor de la expresión de dichos genes, siendo *Irf7* un gen diana crítico de FOXO3 (Litvak et al., 2012). En cultivos primarios de microglía hemos comprobado que la expresión de los genes contenidos en la IFN- $\beta$ S, también se regulan de igual modo que en los macrófagos por FOXO3, pues el silenciamiento de *Foxo3* en los cultivos primarios de microglía mediante el uso de ARNi, produce un claro incremento de la expresión de dichos genes. Nuestra hipótesis es que en la microglía de nuestro ratón modelo de la EA, *APP-PSEN1*, la



regulación de la expresión de los genes de respuesta a IFN se produce a través de FOXO3, el cual a su vez creemos que se regula por PHD3. Cuando eliminamos *Egln3* observamos en la microglía una disminución de la expresión de los genes contenidos en la IFN- $\beta$ S, que podría explicarse por un incremento de la expresión de FOXO3. Hemos observado en cultivos primarios de microglía que, si inhibimos la actividad de las PHDs mediante el tratamiento con DMOG, así como si inhibimos la actividad del proteasoma mediante el tratamiento con MG132, se produce un incremento de la expresión de FOXO3, lo que nos indica que FOXO3 se regula por acción de las PHDs, que producen su inhibición, así como que su degradación se da vía proteasoma en estas células. Hay estudios que muestran que la expresión de FOXO3 está regulada por *Egln2*, gen que codifica para la proteína PHD1, de manera post-transcripcional e independiente de HIF. PHD1 produce la hidroxilación de dos residuos de prolina conservados en diferentes especies (P426 y P437), lo que provoca la disociación entre FOXO3 y la deubiquitinasa USP9x, facilitando así la ubiquitinación de FOXO3 y su degradación (Zheng et al., 2014). También hay estudios en los que se ha observado que entre FOXO3 y PHD3 se produce interacción (Rodríguez et al., 2016). Los experimentos realizados en cultivos de células HEK-293T han mostrado que bajo las condiciones estudiadas no se observa interacción entre FOXO3 y PHD1, y que la interacción observada entre FOXO3 y PHD3 no se produce en las prolinas previamente descritas por Zheng y colaboradores (Zheng et al., 2014). Además esta interacción es dependiente de la presencia de DMOG o MG132, siendo la interacción tan fuerte cuando se inhibe el proteasoma mediante el tratamiento con MG132, que no es capaz de romperse por la adición de SDS. Estos resultados van en línea con nuestra hipótesis de que PHD3 podría ser la responsable de la regulación de FOXO3. Sin embargo, son necesarios más estudios para poder concluir de qué manera se está produciendo esta interacción y cómo esta interacción previene la actividad de FOXO3.

Proponemos que la respuesta relacionada con IFN activada por A $\beta$  a través de la vía PHD3 en la microglía de la EA es consecuencia de una mala adaptación y podría representar una activación de las células microgliales contra una amenaza que no es real, como un virus o una bacteria. Recientemente se ha demostrado que el A $\beta$  tiene propiedades antimicrobianas (Kumar et al., 2016) y la activación de la vía PHD3 podría contribuir a esta respuesta antimicrobiana al inducir el módulo relacionado con la respuesta a IFN. Curiosamente, desde un punto de vista evolutivo, planteamos la hipótesis de que la microglía no ha estado bajo presión selectiva para enfrentar la acumulación patológica de A $\beta$ , ya que es un evento asociado con el envejecimiento que tiene lugar después de que culmina la edad fértil.

Dado que los resultados anteriores obtenidos en el laboratorio mostraron una reducción de las neuritas distróficas alrededor de las placas que correlacionan con una mejora funcional cognitiva y motora, hipotetizamos que la ausencia de PHD3 en estos animales, podría estar promoviendo la



## DISCUSIÓN

expresión de módulos funcionales que son beneficiosos para la EA, mediante el silenciamiento de otros.

En definitiva describimos un enriquecimiento de la expresión de la HMS dependiente de HIF en la AβAM que, concomitantemente con hipoxia, mostró en estudios previos realizados en el laboratorio una despoblación de la microglía en las placas de Aβ en pacientes y en modelos murinos de la EA, con resultados negativos que incluyen un aumento del daño neuronal. Por el contrario, la deficiencia de PHD3, gen diana de HIF1 y altamente expresado en la microglía de la EA, mostró en experimentos previos, un incremento de la microglía situada alrededor de las placas amiloides, así como una protección del deterioro neuronal y comportamental, que se asocia con el silenciamiento de las respuestas antivirales que podrían estar reguladas por FOXO3. Nuestros hallazgos sugieren que la modulación de la vía HIF/PHD3 podría ser un enfoque terapéutico novedoso para la EA, para poder revertir la disfunción microglial, mejorar la eliminación de Aβ y prevenir la neurodegeneración posterior.



## CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**000008745e2000018471**

CSV

**GEISER-8bff-daf6-0743-4697-b100-1dc0-5d4b-77e1**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular**



GEISER-8bff-daf6-0743-4697-b100-1dc0-5d4b-77e1

ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**000008745e2000018471**

CSV

**GEISER-8bff-daf6-0743-4697-b100-1dc0-5d4b-77e1**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular**



GEISER-8bff-daf6-0743-4697-b100-1dc0-5d4b-77e1



## 5. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

### 5.1. CONCLUSIONES

1. El área que rodea a las placas de A $\beta$  esta hipóxica e hipoperfundida y está caracterizada por la expresión del ARNm de *Hif1a* y *Egln3* en la A $\beta$ AM mientras que en la microglía situada lejos de las placas no se observa dicha expresión.
2. HIF1 es uno de los principales factores de transcripción que regula la transcripción de la A $\beta$ AM y es el responsable de la regulación de los genes que componen la HMS cuya expresión está incrementada de forma específica en la microglía de la EA y no en la microglía de otros modelos de neurodegeneración o envejecimiento.
3. El metabolismo oxidativo mitocondrial es una característica común de la DAM y la A $\beta$ AM, mientras que la coexistencia del metabolismo oxidativo junto con la activación de genes mediada por HIF1 es una característica específica de la A $\beta$ AM, que no se observa *in cellulo* cuando la microglía es expuesta a condiciones de hipoxia.
4. El estado metabólico de la A $\beta$ AM se consigue por la activación de HIF1 sin la inducción de *Pdk1*, y la interrupción de esta adaptación metabólica por la hiperactivación de HIF1, induce disfunción microglial.
5. La ausencia de *Egln3* no incrementa la expresión de la HMS en la microglía de la EA y produce una potenciación del perfil transcripcional de activación de la microglía ya presente en la EA.
6. La ausencia de *Egln3* en ratones *APP-PSEN1* produce cambios metabólicos en la microglía y limita la respuesta antiviral, la cual está regulada por el factor de transcripción FOXO3.
7. La falta de *Egln3* de manera específica en la microglía adulta de *APP-PSEN1* no afecta a su proliferación ni a la expresión de la proteína de membrana CD45, y la represión de la respuesta antimicrobiana observada es más débil que al eliminar *Egln3* en todas las células.
8. En microglía, FOXO3 se regula por acción de las PHDs y se degrada vía proteasoma. Además en células HEK-293T se observa interacción entre FOXO3 y PHD3 dependiente del tratamiento con DMOG o MG132, lo que indica que PHD3 podría regular la expresión de FOXO3 y en consecuencia la respuesta antiviral.



## CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

### 5.2. CONCLUSIONS

1. The area surrounding A $\beta$  plaques is hypoxic and hypoperfused and is characterized by *Hif1a* and *Egln3* expression in the A $\beta$ AM, whereas this expression is not observed in the microglia located far from plaques.
2. HIF1 is one of the main transcription factors which regulates A $\beta$ AM transcription and it is responsible for the regulation of the genes included in HMS, whose expression is strongly increased in AD microglia in comparison to microglia from other neurodegeneration or aging models.
3. Mitochondrial oxidative metabolism is a common feature of DAM and A $\beta$ AM, while the coexistence of oxidative metabolism with HIF1-mediated gene activation is a specific feature of A $\beta$ AM, which is not observed *in cellulo* when microglia is exposed to hypoxic conditions.
4. The metabolic state of A $\beta$ AM is achieved by HIF1 activation without induction of *Pdk1*, and the disruption of this metabolic adaptation by overactivation of HIF1, induces microglial dysfunction.
5. The absence of *Egln3* does not increase the expression of HMS in AD microglia and produces an enhancement of the transcriptional profile already present in AD microglia.
6. The absence of *Egln3* in *APP-PSEN1* mice produces metabolic changes in microglia and limits the antiviral response regulated by FOXO3 transcription factor.
7. The partial lack of *Egln3* in the adult *APP-PSEN1* microglia does not affect its proliferation or the CD45 membrane protein expression, and the repression of antiviral response observed is weaker than when *Egln3* is fully eliminated.
8. In microglia, FOXO3 is regulated by PHDs and degraded by the proteasome. Furthermore, interaction between FOXO3 and PHD3 dependent on DMOG or MG132 treatment is observed in HEK-293T cells, which indicates that PHD3 could regulate FOXO3 availability and consequently the antiviral response.



# MATERIALES Y MÉTODOS

ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**000008745e2000018471**

CSV

**GEISER-8bff-daf6-0743-4697-b100-1dc0-5d4b-77e1**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular**



GEISER-8bff-daf6-0743-4697-b100-1dc0-5d4b-77e1

ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**000008745e2000018471**

CSV

**GEISER-8bff-daf6-0743-4697-b100-1dc0-5d4b-77e1**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular**



GEISER-8bff-daf6-0743-4697-b100-1dc0-5d4b-77e1

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

#### 6.1.1. Mantenimiento y cuidados generales

Todos los ratones fueron estabulados bajo condiciones controladas de temperatura (22 °C) y humedad (55 %), con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y un acceso a alimentación y agua *ad libitum*. Los animales fueron manipulados de acuerdo a las pautas de cuidado animal del Consejo de la Comunidad Europea (86/60/CEE), y a las normas aprobadas por el comité ético del Hospital Universitario Virgen del Rocío. El sacrificio de los animales se realizó por inyección intraperitoneal de una dosis letal de tiobarbital (Braun) al 5% (p/v) en solución salina (Fresenius Kabi España S.A.) o por decapitación en el caso de los neonatos.

Los ratones adultos fueron sacrificados y sometidos a perfusión intracardiaca de 30 ml de tampón fosfato salino (PBS; del inglés, *phosphate buffered saline*) (Gibco) para promover el drenaje de sangre. La perfusión de los vasos sanguíneos se analizó por inyección cardíaca de 6 µl por gramo de ratón de *Evans blue* (Sigma) al 2% (p/v) en solución salina en los ratones anestesiados (Wälchli et al., 2014). Para activar la recombinación mediada por *Cre::ERT2*, los animales fueron alimentados durante 30 días con una dieta que contiene TMX (400 mg de citrato de tamoxifeno por kg; Envigo).

#### 6.1.2. Líneas utilizadas

En el presente trabajo se han utilizado diferentes líneas de ratones transgénicos que se enumeran a continuación.

- APP-PSEN1 (APP<sup>swe</sup>.PSEN1<sup>dE9</sup>): Ratón doble transgénico heterocigoto que sobreexpresa la APP quimérica ratón/humano (Mo/HuAPP695) con las mutaciones *Swedish* (K594N/M596L) descritas en casos de Alzheimer familiar, y la proteína PSEN1 de humano mutada que presenta el exón 9 eliminado (PSEN1<sup>dE9</sup>), ambas bajo el control del promotor de la proteína priónica de ratón (*Prnp*). Estos animales proceden de *Jackson Laboratory* (Jankowsky et al., 2004).
- APP<sup>751</sup>SL: Ratón simple transgénico heterocigoto que sobreexpresa la proteína precursora amiloide humana APP751 con las mutaciones *Swedish* (K670N/M671L) y *London* (V717I) descritas en casos de Alzheimer familiar, bajo el control del promotor *Thy-1*. Estos ratones proceden de *Sanofi-Aventis* (Blanchard et al., 2003).



## MATERIALES Y MÉTODOS

- *MAPTp.P301S*: Ratón heterocigoto que expresa la forma mutada P301S de la proteína humana TAU asociada a microtúbulos (MAPT; del inglés, *microtubule associated protein TAU*), bajo la dirección del promotor de *Prnp*. La expresión de la proteína mutante humana MAPT es cinco veces mayor que la expresión de la proteína MAPT endógena de ratón. Estos ratones proceden de *Jackson Laboratory* (Yoshiyama et al., 2007).
- *Cx3cr1-Cre::ERT2*: Ratón heterocigoto que expresa una proteína de fusión Cre-ER (enzima Cre recombinasa junto con el receptor de estrógenos) bajo el promotor de *Cx3cr1* que se expresa en el sistema de fagocitos mononucleares así como en microglía. La expresión de la enzima Cre es inducible por TMX. Estos ratones proceden de *European Mouse Mutant Archive* (Yona et al., 2013).
- *Hif1a<sup>Flox/Flox</sup>*: Ratón que posee sitios loxP a ambos lados del exón 2 del gen *Hif1a*. Cuando este ratón se cruza con un ratón que expresa la Cre recombinasa, la descendencia tendrá el exón 2 eliminado en los tejidos que expresen la Cre. Estos ratones proceden de *Jackson Laboratory* (Ryan et al., 2000).
- *Vhl<sup>Flox/-</sup>*: Ratón que posee un alelo nulo y en el otro tiene sitios loxP flanqueando el exón 1 del gen *Vhl*. Cuando este ratón se cruza con otro ratón que expresa la Cre recombinasa, la descendencia tendrá el exón 1 eliminado en los tejidos que expresen la Cre. Estos ratones proceden de *Jackson Laboratory* (Haase et al., 2001).
- *Egln3<sup>Flox/Flox</sup>*: Ratón que posee sitios loxP flanqueando el exón 2 del gen *Egln3*. Cuando este ratón se cruza con otro ratón que expresa la Cre recombinasa, la descendencia tendrá el exón 2 eliminado en los tejidos que expresan la Cre. Estos ratones proceden de *Jackson Laboratory* (Takeda et al., 2006).
- *Egln3<sup>-/-</sup>*: Estos ratones fueron generosamente cedidos por el Profesor Peter Ratcliffe y llevan insertos en el exón 1 del gen *Egln3* un casete de resistencia a neomicina (Bishop et al., 2008).
- *Cx3cr1-Cre::ERT2; Hif1a<sup>Flox/Flox</sup>*: Proceden del cruce de los ratones *Cx3cr1-Cre::ERT2* junto con los ratones *Hif1a<sup>Flox/Flox</sup>*.
- *Cx3cr1-Cre::ERT2; Hif1a<sup>Flox/Flox</sup>; APP-PSEN1*: Proceden del cruce de los ratones *Cx3cr1-Cre::ERT2; Hif1a<sup>Flox/Flox</sup>* y *APP-PSEN1*.
- *Cx3cr1-Cre::ERT2; Vhl<sup>Flox/-</sup>*: Proceden del cruce de los ratones *Cx3cr1-Cre::ERT2* junto con los ratones *Vhl<sup>Flox/Flox</sup>*.
- *Cx3cr1-Cre::ERT2; Vhl<sup>Flox/-</sup>; APP-PSEN1*: Proceden del cruce de los ratones *Cx3cr1-Cre::ERT2; Vhl<sup>Flox/Flox</sup>* y *APP-PSEN1*.
- *Cx3cr1-Cre::ERT2; Egln3<sup>Flox/Flox</sup>*: Proceden del cruce de los ratones *Cx3cr1-Cre::ERT2* junto con los ratones *Egln3<sup>Flox/Flox</sup>*.



- *Cx3cr1-Cre::ERT2; Egl3<sup>Flox/Flox</sup>; APP-PSEN1*: Proceden del cruce de los ratones *Cx3cr1-Cre::ERT2 Egl3<sup>Flox/Flox</sup>* y *APP-PSEN1*.
- *Egl3<sup>-/-</sup>; APP-PSEN1*: Proceden del cruce de los ratones *Egl3<sup>-/-</sup>* junto con los ratones *APP-PSEN1*.

### 6.1.3. Genotipado de animales

El genotipado de los ratones utilizados se realizó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR; del inglés, *polymerase chain reaction*). El ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico de los animales se extrajo a partir de biopsias de tejido sobrante del marcaje en dedos, o de un fragmento de la cola. Para la extracción del ADN se incubó el tejido con 75 µl de Solución A [NaOH 25 mM (Sigma), EDTA 0,2 mM (Bio-Rad) en H<sub>2</sub>O mili-Q (Millipore)] durante 30 minutos a 98 °C en agitación a 450 revoluciones por minuto (rpm) en un termoagitador (Eppendorf). Una vez digerido se neutralizó la mezcla añadiendo el mismo volumen de la Solución B [Tris-HCl 40 mM (Sigma), pH 5 en H<sub>2</sub>O mili-Q (Millipore)] y mezclando con la ayuda de un agitador tipo vórtex (VWR).

Las reacciones para el genotipado se llevaron a cabo en el termociclador *Professional Trio* (Biometra) y para el genotipado de cada uno de los modelos empleados en este trabajo se utilizaron unos volúmenes de reacción y temperaturas concretas (**Tabla 20**), así como unos oligonucleótidos concretos (**Tabla 21**). Los reactivos usados fueron los siguientes: NH<sub>4</sub> 10x (Bioline), MgCl<sub>2</sub> (Bioline), desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs, Invitrogen), oligonucleótidos (Sigma), enzima ADN polimerasa (BIOTAQ Bioline) y H<sub>2</sub>O mili-Q (Millipore).

Línea	PCR	Volumenes de reacción	Programa de PCR
<b><i>APP-PSEN1</i></b>	App-Ps1	5 µl ADN 2,5 µl NH <sub>4</sub> (10x) 1,25 µl MgCl <sub>2</sub> (50 mM) 0,5 µl dNTPs (10 mM) 0,5 µl Oligo APP Lo (33 µM) 0,5 µl Oligo APP Up (33 µM) 0,15 µl ADN Polimerasa 14,6 µl H <sub>2</sub> O mili-Q	10' a 94 °C 36 ciclos: 1' a 94 °C 1' a 66 °C 1' a 72 °C 10' a 72 °C
<b><i>APP<sub>751</sub>SL</i></b>	App	5 µl ADN 2,5 µl NH <sub>4</sub> (10x) 1,25 µl MgCl <sub>2</sub> (50 mM) 0,5 µl dNTPs (10 mM) 0,5 µl Oligo APPsl Fwd (33 µM) 0,5 µl Oligo APPsl Rev (33 µM) 0,15 µl ADN Polimerasa 14,6 µl H <sub>2</sub> O mili-Q	10' a 94 °C 36 ciclos: 1' a 94 °C 1' a 50 °C 1' a 72 °C 10' a 72 °C





## MATERIALES Y MÉTODOS

Línea	PCR	Volumenes de reacción	Programa de PCR
<b>MAPT<sup>p</sup>.P301S</b>	Mapt	5 µl ADN 2,5 µl NH <sub>4</sub> (10x) 1,25 µl MgCl <sub>2</sub> (50 mM) 0,5 µl dNTPs (10 mM) 0,5 µl Oligo Mapt Fwd (33 µM) 0,5 µl Oligo Mapt Rev (33 µM) 0,15 µl ADN Polimerasa 14,6 µl H <sub>2</sub> O mili-Q	1' a 95 °C 36 ciclos: 15" a 95 °C 15" a 55 °C 10' a 72 °C
<b>Cx3cr1-Cre::ERT2</b>	W-Cre	5 µl ADN 2,5 µl NH <sub>4</sub> (10x) 1,25 µl MgCl <sub>2</sub> (50 mM) 0,5 µl dNTPs (10 mM) 1 µl Oligo Cre Lo2 (33 µM) 1 µl Oligo Cre Up2 (33 µM) 0,15 µl ADN Polimerasa 13,6 µl H <sub>2</sub> O mili-Q	5' a 95 °C 38 ciclos: 30" a 95 °C 30" a 61.5 °C 1'30" a 72 °C 10' a 72 °C
<b>Hif1a<sup>Flox/Flox</sup></b>	Hif1a-Flox	5 µl ADN 2,5 µl NH <sub>4</sub> (10x) 1,25 µl MgCl <sub>2</sub> (50 mM) 0,5 µl dNTPs (10 mM) 0,5 µl Oligo HIF 24b (33 µM) 0,5 µl Oligo HIF 25b (33 µM) 0,15 µl ADN Polimerasa 14,6 µl H <sub>2</sub> O mili-Q	5' a 94 °C 37 ciclos: 30" a 94 °C 45" a 60.5 °C 1' a 72 °C 10' a 72 °C
<b>Vhl<sup>Flox/-</sup></b>	Vhl (+)	5 µl ADN 2,5 µl NH <sub>4</sub> (10x) 1,25 µl MgCl <sub>2</sub> (50 mM) 0,5 µl dNTPs (10 mM) 0,5 µl Oligo FwII (VHL.FLOX) (33 µM) 0,5 µl Oligo Rev (VHL.FLOX) (33 µM) 0,15 µl ADN Polimerasa 14,6 µl H <sub>2</sub> O mili-Q	5' a 94 °C 40 ciclos: 35" a 94 °C 35" a 70 °C 30" a 72 °C 7' a 72 °C
	Vhl (-)	5 µl ADN 2,5 µl NH <sub>4</sub> (10x) 1,25 µl MgCl <sub>2</sub> (50 mM) 0,5 µl dNTPs (10 mM) 0,5 µl Oligo FwI (VHL.FLOX) (33 µM) 0,5 µl Oligo Rev (VHL.FLOX) (33 µM) 0,15 µl ADN Polimerasa 14,6 µl H <sub>2</sub> O mili-Q	5' a 94 °C 40 ciclos: 35" a 94 °C 35" a 62.1 °C 30" a 72 °C 7' a 72 °C
<b>Egln3<sup>Flox/Flox</sup></b>	Egln3-Flox	5 µl ADN 2,5 µl NH <sub>4</sub> (10x) 1,3 µl MgCl <sub>2</sub> (50 mM) 0,5 µl dNTPs (10 mM) 0,5 µl Oligo 26790 (33 µM) 0,5 µl Oligo 26791 (33 µM) 0,5 µl Oligo 26792 (33 µM) 0,5 µl ADN Polimerasa 13,7 µl H <sub>2</sub> O mili-Q	2' a 94 °C 35 ciclos: 30" a 94 °C 45" a 60 °C 30" a 72 °C 10' a 72 °C



## MATERIALES Y MÉTODOS

Línea	PCR	Volumenes de reacción	Programa de PCR
<i>Egln3</i> <sup>-/-</sup>	Egln3-wt	5 µl ADN 2,5 µl NH <sub>4</sub> (10x) 1,25 µl MgCl <sub>2</sub> (50 mM) 0,5 µl dNTPs (10 mM) 0,5 µl Oligo WT2 (33 µM) 0,5 µl Oligo REV1 (33 µM) 0,15 µl ADN Polimerasa 14,6 µl H <sub>2</sub> O mili-Q	2' a 94 °C 41 ciclos: 30" a 94 °C 30" a 65 °C 1' a 72 °C 10' a 72 °C
	Egln3-mut	5 µl ADN 2,5 µl NH <sub>4</sub> (10x) 1,25 µl MgCl <sub>2</sub> (50 mM) 0,5 µl dNTPs (10 mM) 0,5 µl Oligo REC2 (33 µM) 0,5 µl Oligo REV2 (33 µM) 0,15 µl ADN Polimerasa 14,6 µl H <sub>2</sub> O mili-Q	2' a 94 °C 41 ciclos: 30" a 94 °C 30" a 62 °C 1' a 72 °C 10' a 72 °C

**Tabla 20. Condiciones de reacción de PCR para genotipado.** Condiciones de reacción de PCR para el genotipado de las diferentes líneas de ratones usando los oligonucleótidos de la tabla 21.

PCR	Oligonucleótidos	Secuencia
<b>App-Ps1</b>	APP Lo	CTTGTAAGTTGGATTCTCTATATCCG
	APP Up	GACTGACCACTCGACCAGGTTCTG
<b>App</b>	APPSl Fwd	GGCTGAGGAACCTACGAAGA
	APPSl Rev	CAAAGTACCAGCGGGAGATCA
<b>Mapt</b>	Mapt Fwd	GGCATCTCAGCAATGTCTCC
	Mapt Rev	GGTATTAGCCTATGGGGACAC
<b>W-Cre</b>	Cre Lo2	TGTTCCAGGGATCGCCAGGCG
	Cre Up2	TGAAACAGCATTGCTGTACAC
<b>Hif1a-Flox</b>	HIF 24b	TAAGCAGTTAAGAGCACTAGTTGG
	HIF 25b	ATGTGGAGCTATCTCTCTAGACCC
<b>Vhl (+)</b>	FwII (VHL.FLOX)	CTAGGCACCGAGCTTAGAGGTTTGCG
	Rev (VHL.FLOX)	CTGACTTCCACTGATGCTTGTCACAG
<b>Vhl (-)</b>	FwI (VHL.FLOX)	CTGGTACCCACGAACTGTC
	Rev (VHL.FLOX)	CTGACTTCCACTGATGCTTGTCACAG
<b>Egln3-Flox</b>	26790	CAGCATCTT TGGGATGTCTCT
	26791	TGGAATGGCATACTCTTTTGA
	26792	GGTGAGCAAAAACAGGAAGG
<b>Egln3-wt</b>	WT2	GAGCACCCCTTATAAAAAGCAAGTGA
	REV1	TGCAGAAACACCCAGATGA
<b>Egln3-mut</b>	REC2	GGAAAAGCGCCTCCCTA
	REV2	GGTTATTAGTGCAGAAACACCCC

**Tabla 21. Oligonucleótidos usados para el genotipado.** Secuencias de los nucleótidos empleados para el genotipado por PCR de las diferentes líneas de ratones usadas.



## MATERIALES Y MÉTODOS

Para analizar el tamaño de los fragmentos resultantes de la reacción de PCR se separaron siguiendo el método de electroforesis en gel de agarosa (Sambrook et al., 1989). Para ello se prepararon geles de agarosa (Bioted) al 2-2,5% (p/v) en tampón TBE [Tris-base 0,09 M (Sigma), ácido bórico 0,0899 M (Sigma), EDTA 0,2 mM (Bio-Rad)] a los que se añadieron *Midori Green Advance* (Nippon Genetics) al 4% (v/v), capaz de intercalarse en el ADN y permitir su visualización posterior por luz ultravioleta. A cada reacción de PCR se le añadió un 1/10 de volumen de tampón de carga 10x [Azul de bromofenol 0,25% (v/v) (Sigma), xileno-cianol FF 0,25% (v/v) (Sigma), glicerol 30% (v/v) (Sigma)] y se cargaron 20 µl de cada muestra. Para determinar el tamaño de los fragmentos de ADN se utilizó el marcador *HyperLadder* 1 kb (Bioline), y tras la electroforesis el ADN se visualizó en un transiluminador con luz ultravioleta (BioDoc-IT Imaging System).

## 6.2. CULTIVOS CELULARES

### 6.2.1. Cultivos primarios de microglía

Para la obtención de cultivos primarios de microglía se siguió el protocolo descrito por Saura y colaboradores en 2003 con algunas modificaciones (Saura et al., 2003). Con este método se obtienen cultivos mixtos de microglía y astrocitos.

Los cultivos mixtos se prepararon a partir de ratones neonatos (P0-P3) WT o *Cx3cr1-Cre::ERT2; Hif1a<sup>Flox/Flox</sup>* que fueron decapitados y a los que se les extrajo el cerebro. Tras retirar los bulbos olfatorios se eliminaron las meninges bajo lupa SZX16 (Olympus) en medio *Hybernat-E* frío (Gibco). El tejido se homogeneizó suavemente con tijeras de microcirugía en tripsina-EDTA 1x en PBS (Biowest) y posteriormente se incubó durante 7 minutos a 37 °C en un termociclador (Eppendorf) a 900 rpm. La reacción de tripsinización se paró mediante la adición de medio DMEM/F-12 1:1 (Gibco) suplementado con suero fetal bovino (FBS; del inglés, *fetal bovine serum*) al 10% (v/v) (PAA), L-glutamina 2 mM (Gibco), penicilina/estreptomicina 1% (v/v) (Lonza), gentamicina 10 µg/ml (PAA) y aminoácidos no esenciales al 1% (v/v) (Gibco), y tras ello se filtraron las células por una malla de nylon de 40 µm de poro (Becton Dickinson). Para la obtención de los cultivos ricos en microglía las células se sembraron a una concentración de 2,5 x 10<sup>5</sup> células/cm<sup>2</sup> en placas (Nunc) previamente tratadas con poli-D-lisina (Sigma) y en medio DMEM/F-12 suplementado. Los cultivos se mantuvieron a 37 °C durante 21 días en un incubador humidificado con un 5% de CO<sub>2</sub>, cambiando el medio cada 2-3 días. Durante la última semana el medio condicionado retirado de los cultivos se almacenó a 4 °C para su uso posterior en los tratamientos aplicados. Tras 21 días de cultivo se llevó a cabo el aislamiento de la población microglial mediante tripsinización suave, que consiste en levantar la monocapa de células no microgliales sin que la microglía se desprege de la placa. Para ello se retiró el medio condicionado



por las células del cultivo mixto, que guardamos para su posterior uso, se lavaron las células con medio DMEM/F12 sin aditivos, y se añadió 0,25% tripsina-EDTA 1x (Gibco) diluida en proporción 1:3 en medio DMEM/F12 sin aditivos. Tras 15-20 minutos de incubación a 37°C la monocapa de células no microgliales se levanta, se añade medio DMEM/F12 suplementado para inactivar la tripsina y se deshecha el sobrenadante, obteniendo así cultivos prácticamente puros de microglía. Tras el aislamiento, las células se mantuvieron con el medio condicionado en el incubador durante 24 horas antes de realizar ningún tratamiento.

## 6.2.2. Cultivos de células HEK-293T

Las células HEK-293T fueron cultivadas en medio DMEM (Gibco) suplementado con FBS al 10% (v/v) (Sigma) y mantenidas a 37 °C en un incubador humidificado con un 5% de CO<sub>2</sub>. Cada 2 o 3 días se realizaban pases para mantener la línea celular.

## 6.2.3. Tratamientos *in cellulo*

### 6.2.3.1. Hipoxia

Las células aisladas de microglía se expusieron a condiciones de hipoxia (1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) en un incubador con capacidad de control de la temperatura y de la concentración de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, variable y ajustada con un mezclador de gases (Coy Laboratory). Los tiempos de exposición fueron de 6 horas o 24 horas según los diferentes experimentos.

### 6.2.3.2. DMOG

El DMOG (Sigma) es un compuesto utilizado como mimético químico de la hipoxia, al producir la inhibición de las PHDs y dar lugar a la estabilización de HIF1α en normoxia (Jaakkola et al., 2001). Para las células de cultivos primarios de microglía el DMOG se usó a una concentración de 0,1 mM partiendo de un *stock* a concentración 1 M en dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma). Los tiempos de exposición fueron de 6 horas o 24 horas según los diferentes experimentos. Como control en todos los experimentos se utilizaron cultivos a los que se añadió el mismo volumen de DMSO que el añadido de DMOG. Para las células HEK-293T el DMOG se usó a una concentración de 1 mM partiendo de un *stock* a concentración 1 M en PBS. Los tiempos de exposición fueron de 24 horas. Como control en todos los experimentos se utilizaron cultivos a los que se añadió el mismo volumen de PBS que el añadido de DMOG.

### 6.2.3.3. TMX

Los cultivos se trataron con TMX (Sigma) a concentración de 100 nM disuelto en etanol al 96% (Merk) durante los 6 días previos al aislamiento de la microglía por tripsinización suave. Como control en todos los experimentos se utilizaron cultivos a los que se añadió el mismo volumen de etanol al 96% que el añadido de TMX.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.2.3.4. MG132

El MG132 (Sigma) es un potente inhibidor del proteasoma. Para las células de cultivos primarios de microglía se usó a una concentración de 10  $\mu$ M durante un periodo de 6 horas, partiendo de un *stock* a 52,6 mM en DMSO (Sigma) en las células de microglía aislada. Como control en todos los experimentos se utilizaron cultivos a los que se añadió el mismo volumen de DMSO que el añadido de MG132. Para las células HEK-293T se usó a una concentración de 12,5  $\mu$ M durante un periodo de 4 horas y media, partiendo de un *stock* a 12,5 mM en DMSO (Sigma).

### 6.2.3.5. ARNi

Las células aisladas de microglía fueron transfectadas con ARNi de *Foxo3* a una concentración final de 26,67 nM durante 4 horas, usando *Blue Buffer* (Lipocalyx) para diluir el ARNi y como agente de transfección *Viromer Blue* (Lipocalyx) según las instrucciones del fabricante. Tras 4 horas se retiró el medio y se sustituyó por medio condicionado recogido y almacenado a 4 °C los días previos al aislamiento de la microglía. Cada 24 horas se cambió el medio por medio condicionado nuevo y las células fueron recogidas a las 48 horas del inicio del tratamiento. Como control en todos los casos se usó un ARNi de un gen homólogo de *Hif1a* de *Drosophila melanogaster* (*Sima*). En la **Tabla 22** se muestran los ARNi usados.

ARNi	Referencia o Secuencia
<i>Foxo3</i>	Cell Signaling #8620
<i>Sima</i>	CCCUACAUCGCCGAUCGAUG[dT][dT][dT][dT]
	CAUCGAUCGGGAUGUAGGG[dT][dT][dT][dT]

**Tabla 22. Secuencias de ARNi.** Referencia o secuencia de los ARNi empleados para el silenciamiento en cultivos primarios de microglía.

### 6.2.3.6. Transfecciones

Las células HEK-293T fueron transfectadas con las cantidades óptimas de diferentes plásmidos (**Tabla 23**) según experimentos anteriores realizados, usando el reactivo *TurboFect* (Thermo Scientific) según las instrucciones del fabricante. Para equiparar en todas las condiciones la cantidad total de ADN transfectado se complementó utilizando el correspondiente plásmido vacío. Tras 4 horas se retiró el medio y se sustituyó por medio fresco DMEM suplementado con FBS. Las células fueron recogidas a las 24 horas del inicio del tratamiento.

Para la obtención del plásmido pCMV6-FOXO3 (Myc-DDK *tagged*) con las mutaciones P426A/P437A se realizó la mutagénesis dirigida consecutiva de P426A y P437A a partir del plásmido pCMV6-FOXO3 (Myc-DDK *tagged*) (Origene) usando *Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit* (New England) según las instrucciones del fabricante.



## MATERIALES Y MÉTODOS

Plásmido	Cantidad de plásmido usada en 5 ml de volumen de cultivo	Casa comercial o referencia
pCDNA3	300 ng	Thermo Fisher
pCDNA3-PHD1 (V5 tagged)	3 µg	Cedido por el laboratorio del Profesor Peter Ratcliffe (Masson et al., 2004)
pCDNA3-PHD3 (V5 tagged)	300 ng	Cedido por el laboratorio del Profesor Peter Ratcliffe (Masson et al., 2004)
pCMV6-FOXO3 (Myc-DDK tagged)	50 ng	Origene
pCMV6-FOXO3 (Myc-DDK tagged) con las mutaciones P426A/P437A	50 ng	Mutagénesis dirigida a partir del plásmido pCMV6-FOXO3 (Myc-DDK tagged) de Origene
pEF1	3 µg	Thermo Fisher
pEF1-HIF1α (DDK tagged)	3 µg	Cedido por el laboratorio de Peter Ratcliffe (No publicado)

Tabla 23. Plásmidos usados para las transfecciones en las células HEK-293T. Plásmido, referencia y cantidad usada para las transfecciones realizadas en células HEK-293T.

### 6.3. AISLAMIENTO DE MICROGLÍA DEL TEJIDO CEREBRAL DE RATONES ADULTOS

El método utilizado para aislar microglía del resto de células presentes en la corteza cerebral de ratones adultos fue el descrito previamente por Orre y colaboradores (Orre et al., 2014b) con alguna modificación.

Los ratones se anestesiaron y se les realizó perfusión intracardiaca con PBS (Gibco) seguida de HBSS (-CaCl<sub>2</sub>/-MgCl<sub>2</sub>) (Gibco). Se extrajo el cerebro y se aisló la corteza bajo lupa SZX16 (Olympus), que se disoció a continuación utilizando el disociador de tejidos *Tissue Chopper* (Vibratome 800 series). Tras la digestión mecánica se realizó una digestión química usando una combinación de papaína (Worthington) a una concentración final de 8 U/ml y DNasa I (Sigma) a una concentración final de 80 Kunitz U/ml en un *buffer* tamponado con PIPES [EDTA 1,1 mM (Bio-Rad), L-Cisteína 5,5 mM (Sigma), glucosa 0,41% (v/v) (Sigma), NaCl 112,5 mM (Sigma), KCl 4,5 mM (Sigma), NaOH 36 mM (Sigma) y PIPES 18 mM (Sigma), a pH 7,4]. Con esta solución se incubó el tejido durante 50 minutos a 37 °C en un agitador de noria. Tras este tiempo se añadió 25 Kunitz U/ml de DNasa I en medio MEM (Gibco) suplementado con albúmina de suero bovino (BSA; del inglés, *bovine serum albumin*) (AppliChem) al 0,5% (p/v), y se incubó durante 15 minutos más. La mezcla se centrifugó y el pellet se disgregó con ayuda de una pipeta en el medio MEM suplementado con BSA hasta obtener una suspensión de células, que se filtró con un filtro de nylon de 70 µm de poro (Becton Dickinson) para eliminar fragmentos de tejido no disgregado.



## MATERIALES Y MÉTODOS

Una vez obtenida la suspensión de células se lavó y resuspendió en la solución de medio MEM con BSA y se depositó cuidadosamente sobre *Percoll* (GE healthcare) al 90% (v/v) preparado en PBS 10x [NaCl 1,4 M (Sigma), KCl 27 mM (Sigma), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100 mM (Sigma), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 18 mM (Sigma) a pH 7,4], para generar un gradiente. A continuación, mediante centrifugación la suspensión celular se separó en 3 fases, una fase superior que contenía restos celulares y se descartó, y las fases intermedia e inferior que contenían la mielina y las células, que fueron recogidas y diluidas en 5 veces su volumen usando el medio MEM suplementado con BSA. Tras centrifugación el pellet de células se resuspendió en medio GKN [NaCl 136,89 mM (Sigma), KCl 5,37 mM (Sigma), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM (Sigma), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 5 mM (Sigma), D-(1)-glucosa 11 mM (Sigma) y BSA al 0,5% (p/v) a pH 7,4] y se procedió al aislamiento específico de las células de microglía por citometría mediante FACS.

Para ello se marcó la suspensión celular con los anticuerpos primarios monoclonales conjugados anti-CD11b-APC (eBioscience, Cat.# 17-0112) y anti-CD45-PE (eBioscience; Cat.# 12-0451) a una dilución 1:200 en PBS (Gibco) con BSA (AppliChem) al 0,5% (p/v), y se incubó durante 30 minutos a 4 °C. Como control negativo se tiñeron las células con el isotipo control-APC (eBioscience, Cat.# 17-4031) y el isotipo control-PE (eBioscience, Cat.# 12-4031) a una dilución 1:200 en la misma solución. Tanto las muestras control como las muestras experimentales se incubaron con el anticuerpo bloqueador anti-CD16/CD32 (Becton Dickinson, Cat.# 553142) a dilución 1:200 simultáneamente con los anticuerpos correspondientes. Las células se lavaron y se separaron usando el citómetro de flujo *FACS Aria Fusion* (Becton Dickinson) y los datos adquiridos fueron analizados con el *software* de *FACSDiva 8.0* (Becton Dickinson). La estrategia de selección de las poblaciones y el análisis de datos se hicieron de acuerdo a directrices e informes anteriores (Herzenberg et al., 2006; Orre et al., 2014b) (**Figuras 47 y 48**).

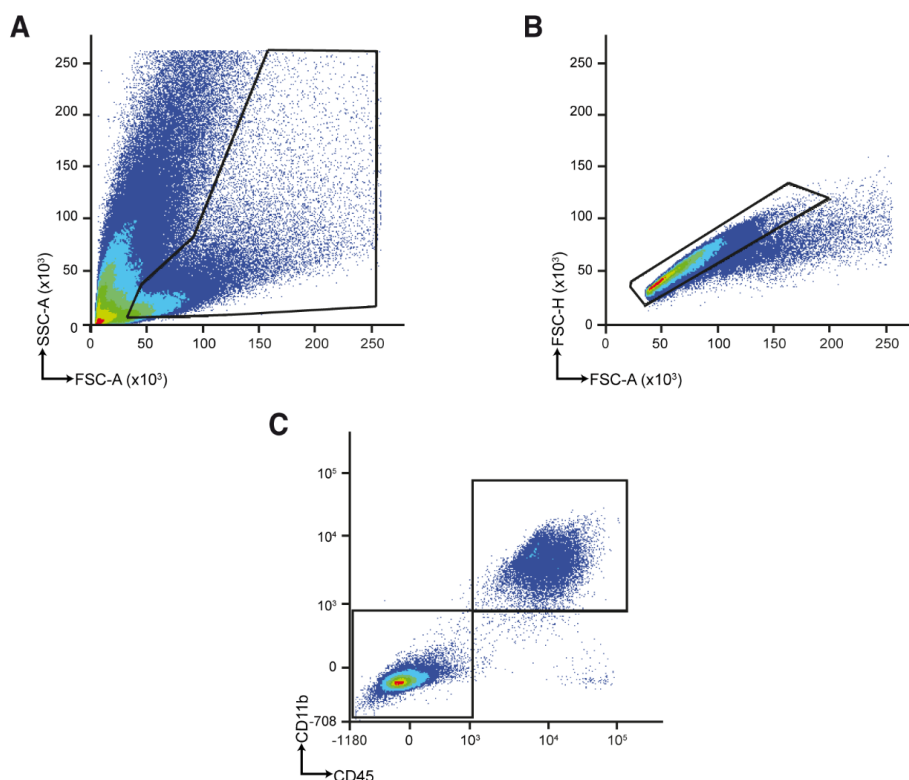
El debris y las células muertas se descartaron mediante la representación de dispersión lateral (SSC; del inglés, *side scatter*) frente a dispersión frontal (FSC; del inglés, *forward scatter*), que proporcionan información sobre la complejidad y el tamaño celular, respectivamente. Seguidamente, se descartaron los dobletes y se seleccionaron las células individuales, que muestran una relación lineal en la representación altura de dispersión frontal (FSC-H; del inglés, *forward scatter height*) versus área de dispersión frontal (FSC-A; del inglés, *forward scatter area*). A continuación, se identificaron células microgliales como eventos positivos para los marcadores CD11b y CD45. La selección de la subpoblación de microglía se realizó en una gráfica de densidad de contorno escalada al 15% de probabilidad y se consideró que había una segunda subpoblación microglial cuando se encontraba más de un foco independiente con estos ajustes (**Figura 47**). Los porcentajes son relativos al número total de células individuales.





## MATERIALES Y MÉTODOS

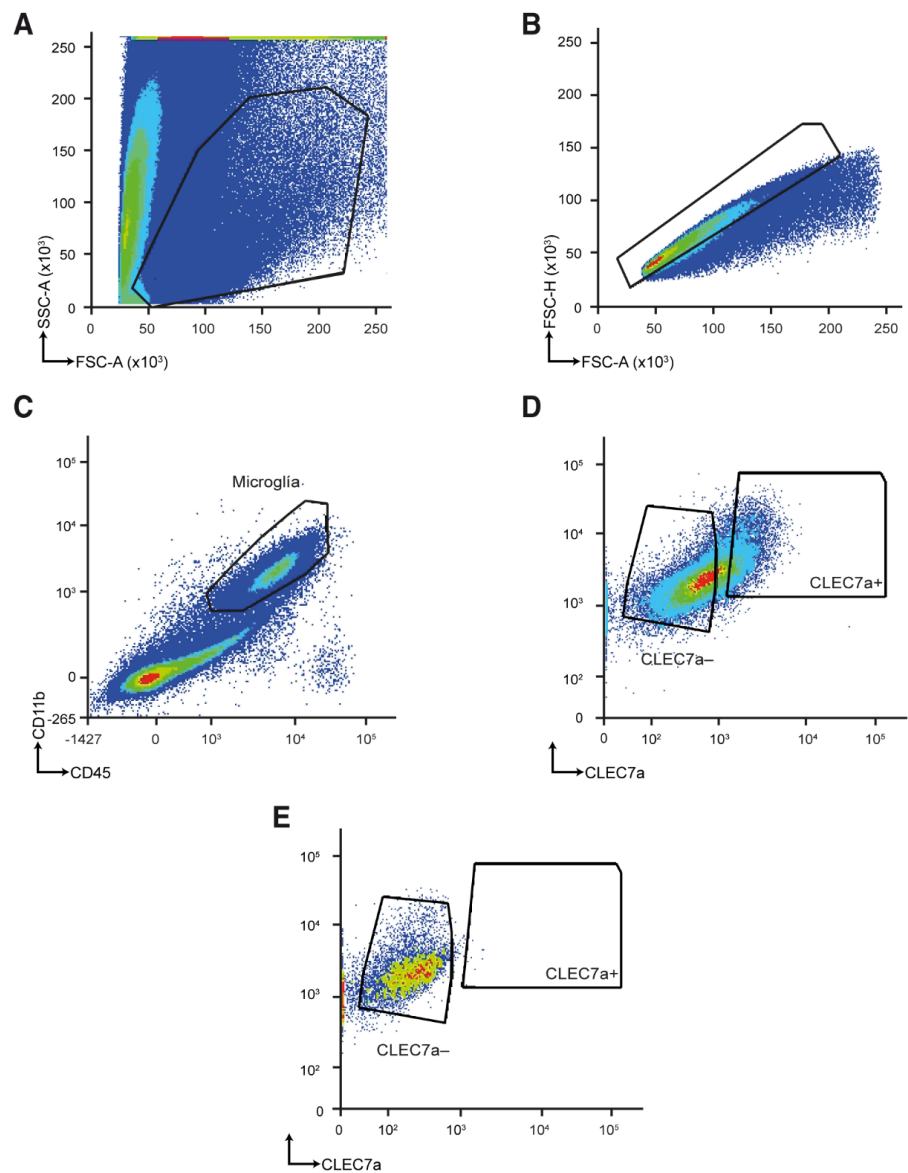
Para separar poblaciones con alta y baja expresión de CLEC7a, se usaron los anticuerpos primarios monoclonales conjugados anti-CD11b-CFblue (Immunostep, Cat.# MO11BCFB) a una dilución 5:100 y anti-CD45-PE (Immunostep, Cat.# MO45PE) a una dilución 3:100 en combinación con el anticuerpo anti-CLEC7a-FITC (R&D Systems, Cat.# FAB17561G) a dilución 15:100 y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente en PBS con BSA al 0,5% (p/v). Como control para establecer valores de autofluorescencia en el canal FITC se usaron células teñidas con anti-CD45-PE y anti-CD11b-CFblue pero no con anti-CLEC7a-FITC (**Figura 48**).



**Figura 47. Estrategia empleada para el aislamiento de células de microglía CD11b+/CD45+.** La identificación de la población se realizó de acuerdo a directrices e informes anteriores (Herzenberg et al., 2016; Orre et al., 2014b) en gráficos de densidad de contorno. **(A)** Los desechos y células muertas fueron descartadas por la dispersión frontal (FSC) y lateral (SSC) de los eventos. **(B)** Los eventos únicos fueron seleccionados de acuerdo a la altura (FSC-H) versus al área (FSC-A). **(C)** Las células de microglía, positivas para los marcadores CD45 y CD11b, fueron seleccionadas y se subdividieron de acuerdo con el eje CD45 cuando se observó una segunda subpoblación microglial.



MATERIALES Y MÉTODOS



**Figura 48. Estrategia empleada para el aislamiento de células de microglía CLEC7a+.** La identificación de la población se realizó de acuerdo a directrices e informes anteriores (Herzenberg et al., 2016; Orre et al., 2014b) en gráficos de densidad de contorno. **(A)** Los desechos y células muertas fueron descartadas por la dispersión frontal (FSC) y lateral (SSC) de los eventos. **(B)** Los eventos únicos fueron seleccionados de acuerdo a la altura (FSC-H) versus al área (FSC-A). **(C)** Se seleccionaron las células de microglía, positivas para los marcadores CD45 y CD11b. **(D,E)** La región seleccionada para aislar la microglía CLEC7a+ se muestra en (D) y fue definida realizando el mismo experimento sin el anticuerpo CLEC7a (E).



## 6.4. EXTRACCIÓN DE ARN

El ARN procedente tanto de la microglía de cultivos primarios, como de la microglía aislada por FACS así como de las muestras de cortezas de cerebros de ratón, fue extraído usando el reactivo *TRIzol* (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Todo el proceso se llevó a cabo en un entorno limpio de ARNasas y usando puntas con filtros.

### 6.4.1. Extracción de ARN en microglía de cultivo primario

A las células de microglía de los cultivos primarios se les retiró el medio de cultivo y se homogeneizaron mediante la adición de 350 µl de *TRIzol* a cada pocillo (en las placas de 6 pocillos). Se recogieron las muestras en microtubos y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 75 µl de cloroformo (Sigma) a cada muestra, se agitaron y se incubaron durante 3 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se centrifugaron a 4 °C. Esta centrifugación separó las muestras en 3 fases, una fase superior acuosa donde se encontraba el ARN, una interfase blanca donde se encontraba el ADN y una fase inferior roja de fenol-cloroformo donde se encontraban las proteínas. La fase donde se encontraba el ARN se recogió y se puso en un microtubo limpio al que se le añadió 175 µl de isopropanol (Sigma) con glicógeno (Roche) al 0,1% (v/v) y se incubó durante toda la noche a -20 °C para que precipitara el ARN. Después se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron. El pellet de ARN se lavó con 350 µl de etanol (Merk) al 75% (v/v) y se volvió a centrifugar. Tras dejar secar el pellet de ARN, se resuspendió en un volumen de 20 µl en H<sub>2</sub>O libre de nucleasas (Promega) y se almacenó a -80 °C al menos durante una noche antes de proceder a su retrotranscripción, para asegurar su total resuspensión.

### 6.4.2. Extracción de ARN en microglía aislada por FACS

En el caso de las muestras de microglía obtenidas tras aislamiento por FACS, las células fueron precipitadas con una centrifugación de 2400 g durante 5 minutos a 4 °C. Se retiró el sobrenadante y se añadió 500 µl de *TRIzol*. El protocolo seguido fue el mismo que para las células de microglía de cultivos primarios, pero escalando las cantidades de cada reactivo en función del volumen inicial usado de *TRIzol*. El pellet de ARN se resuspendió en 10 µl de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas (Promega) y se almacenó a -80 °C al menos durante una noche para asegurar su total resuspensión, antes de proceder a su amplificación.

### 6.4.3. Extracción de ARN en muestras de corteza

Se obtuvieron muestras de corteza del hemisferio izquierdo a partir de ratones de 6 meses o 12 meses de edad. Para ello se sacrificaron los animales en un entorno limpio de ARNasas y fueron perfundidos con PBS. Los cerebros se extrajeron y se diseccionaron las áreas de interés bajo lupa



## MATERIALES Y MÉTODOS

SZX16 (Olympus) en hielo en solución PBS. Inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C en criotubos libres de ARNasas.

Para la extracción del ARN se traspasó el tejido a microtubos con cierre de seguridad (*Safe Lock*, Eppendorf), se añadieron 200 µl de reactivo *TRIzol* y el mismo volumen de microbolas de vidrio de 0,5 µm de diámetro (GB05, Next Advanced Inc.) que de tejido inicial teníamos. Todo ello se llevó a cabo manteniendo las muestras en hielo. Tras sellar con parafilm los tubos, se introdujeron en el homogeneizador *Bullet Blender* (Next Advance Inc., Averill Park, NY) y se sometieron a 3 minutos de homogeneización a velocidad 8 en la cámara fría. Posteriormente, se añadieron 500 µl más de *TRIzol* y se continuó con el protocolo de extracción de ARN con *TRIzol* de igual manera que en los casos anteriores. Finalmente el pellet de ARN fue resuspendido en 200 µl de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas (Promega) y se almacenó a -80 °C al menos durante una noche antes de proceder a su retrotranscripción, para asegurar su total resuspensión.

## 6.5. RETROTRANSCRIPCIÓN DEL ARN

Previamente a la retrotranscripción del ARN se realizó en todos los casos un tratamiento con DNasa, una enzima encargada de eliminar el ADN contaminante.

El ARN se cuantificó en *Nanodrop 2000* (Thermo Scientific), y se trataron, 500 ng en el caso de las muestras procedentes de microglía aislada por FACS (ARN previamente amplificado como está descrito en el apartado 6.11.1 de materiales y métodos) y de microglía de cultivos primarios y 800 ng en el caso de las muestras procedentes de corteza, con el kit *PerfeCTa DNase I* (Quanta Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello se añadió al ARN 1,45 µl de 10x *Reaction buffer* (Quanta Bioscience) y 1 µl de *DNase I* (2 U/µl) (Quanta Bioscience) en un volumen final de reacción de 14,55 µl y se incubó la mezcla en el termociclador *Professional Trio* (Biometra) a 37 °C durante 30 minutos. La reacción se paró mediante la adición de 1,45 µl de 10x *Stop buffer* (Quanta Bioscience) y su incubación durante 10 minutos a 65 °C. Justo al acabar la digestión con DNasa se procedió a la reacción de retrotranscripción.

La reacción de retrotranscripción se encarga de sintetizar la primera hebra de ADN complementario (ADNc) a partir de ARN, para ello se utilizó la enzima retrotranscriptasa *qScript cDNA Super Mix* (Quanta Biosciences). Se añadió 4 µl de esta enzima a los 16 µl de reacción finales del tratamiento con DNasa. La reacción de síntesis de la hebra de ADNc se llevó a cabo en el termociclador *Professional Trio* (Biometra), y las condiciones utilizadas fueron: 5 minutos a 25 °C, 30 minutos a 42 °C, 5 minutos a 85 °C. El ADNc resultante se almacenó a -20 °C y se procuró congelar y descongelar el menor número de veces posibles.



## 6.6. PCR CUANTITATIVA

### 6.6.1. Condiciones de PCR cuantitativa con *Syber Green*

Para cuantificar la expresión del ARNm de todos los genes estudiados en este trabajo (**Tabla 24**), a excepción de *Vhl*, se realizó PCR cuantitativa (qPCR; del inglés, *quantitative PCR*) con *Syber Green*. Como gen control se utilizó *Hmbs* (**Tabla 24**). El diseño de los oligos se realizó con ayuda del *software Primer Express 2.0* (Applied Biosystems). Las reacciones se prepararon en hielo en un volumen final de 20  $\mu$ L incluyendo: 0,5  $\mu$ L de ADNc molde, 3,33  $\mu$ L de oligonucleótido *forward* 2 mM (Sigma), 3,33  $\mu$ L de oligonucleótido *reverse* 2 mM (Sigma), 10  $\mu$ L de *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) y 2,84  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas (Promega). Una vez mezcladas, las reacciones se cargaron en una placa de 96 pocillos *Fast Optical* de 0,1 mL (Applied Biosystems) que se selló con un adhesivo óptico *Optical Adhesive Film* (Applied Biosystems) y posteriormente se centrifugó durante 1 minuto a 1500 rpm. La reacción se llevó a cabo en el termociclador *ViiA7* (Applied Biosystems) y se siguió el siguiente programa de amplificación: 2 minutos a 50 °C, 10 minutos a 95 °C, 45 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C, tras los cuales las muestras fueron expuestas 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C y 15 segundos a 95 °C. Mediante el método del  $\Delta$ CT y  $\Delta\Delta$ CT (Livak & Schmittgen, 2001) se compararon los niveles de expresión de diferentes muestras entre sí.

Gen	Oligonucleótido Forward	Oligonucleótido Reverse
<b><i>Bhlhe40</i></b>	CGAAGACAGCAAGGAACTTACAAA	TCGTTAATCCGGTCACGTCTCT
<b><i>Cd33</i></b>	GAGGCAGGAAGCGATCACAT	GTGTATGGAACATCCTGGAGTCAC
<b><i>Ccl5</i></b>	GCCCACGTCAAGGAGTATTCTAC	CAAACACGACTGCAAGATTGGA
<b><i>Ccng2</i></b>	TGCCGAGTTGTCTTCTCCAAA	AAGGCACAGAGCTAATACAGATGGT
<b><i>Cxcl14</i></b>	GCGAGGAGAAGATGGTTATCGT	CCCGGTACCTGGACATGCT
<b><i>Ddx58</i></b>	TGGCCAAAGGTCTTGCAACT	GCTTTCAGCCCTTTTGAAACC
<b><i>Dkk2</i></b>	TTTGTGTGCTCGCCACTT	ATGGAGCACTGGTTGCAGAT
<b><i>Egln1</i></b>	TGACCGGCGTAACCCTCAT	TGCGTACCTTGTGGCGTATG
<b><i>Egln3</i></b>	CAGACCGCAGGAATCCACAT	CATCGAAGTACCAGACAGTCATAGC
<b><i>Ero11</i></b>	CCGTGGATGAGTCTCTGAGTGA	CATCATGCTTGGTCCACTGAAG
<b><i>Foxo3</i></b>	TGCAAACCCTCTCGGACTCT	GGAAGGTTTGCAGTACTGAAATACA
<b><i>Hif1a</i></b>	AGATCTCGGCGAAGCAAAGAGT	CGGCATCCAGAAGTTTCTCACAC
<b><i>Hmbs</i></b>	CCATACTACCTCTGGCTTACTATTG	GGTTTTCCCGTTTGAGATG
<b><i>Ifi44</i></b>	TGAAGATGGAATCTCTGACAAGTACA	CATCCTTGGCCTTGATGGAAT
<b><i>Ifit1</i></b>	GAACAGCTACCACCTTTACAGCAA	GGTCACCATCAGCATTCTCTCC
<b><i>Ifit2</i></b>	CACAGCAGTCATGAGTACAACGAG	CTTCTGCTATCAGGTTCCAGGTG
<b><i>Irf7</i></b>	GAAGACCCTGATCTGGTGAAG	CTAGACAAGCACAAGCCGAGACT
<b><i>Mamdc2</i></b>	TGCGTTTCTGCCTTGGATACT	TCCATATAGACATAATGGCCTTCCT
<b><i>Mid1</i></b>	GCTCAGCAGATTGCAAAGTGTAA	GAGCGATGCAGACCTCTCAAG



## MATERIALES Y MÉTODOS

Gen	Oligonucleótido Forward	Oligonucleótido Reverse
<i>Mxi1</i>	CAGGAGATGGAGCGGATACG	TGAAGAGATGGTTGATCCAATGC
<i>Oas1a</i>	CCGGTCTCTGAGCTTCAAGCT	TGCTGGAAGTATTAACATGACCCA
<i>Oas1g</i>	GCTGTGGTACCCATGTTTATGAAA	CACCTGCTCAAAAGGTACAGGAA
<i>Oas2</i>	CAATTACTTCCAGTCTTCAATCCTCTAC	TGGTGAGGCTCTTACTTGATCCA
<i>Oasl1</i>	TCCTGAGGCAGGAGAATTTC	CCCAAAGCAGCCTACCTTGA
<i>Oasl2</i>	GCGCTGGAATGTACAGCGA	CCAGAGTGTCCAATCCACTGTTC
<i>Pdk1</i>	CATCTCATCGAAAGCACATTGG	CCTAGCGTTCTCATAGCCATCTTTA
<i>Postn</i>	TGGAAACCATTGGAGGCAAA	ATAGCCGTCGGATACACAAAGAC
<i>Prr15</i>	GCCCTGAAAGCCCCTACAG	TCTCCACGCAGACTTGCT
<i>Rsad2</i>	CTGATTGGCCGTGGTCAAG	CTTTTGAAGGTTTCCACATGGT
<i>Trim30d</i>	TGGAAAAGCTGGAAGAGTCTGAA	CCAACTCCCTCTGCTCCCTTA
<i>Usp18</i>	TCGGTGATACCAAGGAACAGTCT	TCACGCAAAGAGTTCATAGTGTATT
<i>Vegfa</i>	CCAGCACATAGGAGAGATGAGCTT	TCTGTCTTTCTTGGTCTGCATTC
<i>Zbp1</i>	GCCCAGCCTAGCCTTGATG	CCAGAGCCTTGGCGATGT

**Tabla 24. Oligonucleótidos usados para qPCR.** Secuencias de los oligonucleótidos empleados para medir el nivel de expresión de ARNm por qPCR.

### 6.6.2. Condiciones de PCR cuantitativa con sonda *Taqman*

La expresión del ARNm de *Vhl* se cuantificó mediante sonda *Taqman* (Tabla 25), usando como gen control *Hmbs*. Las reacciones se prepararon en hielo en un volumen final de 20 µl, incluyendo: 2 µl de ADNc molde, 1 µl de sonda *Taqman* 20x (Thermo Scientific), 10 µl de *iTaq Universal Probes Supermix* 2x (Bio-Rad) y 7 µl de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas (Promega). La mezcla se cargó en una placa de 96 pocillos *Fast Optical* de 0,1 mL (Applied Biosystems) que se selló con un adhesivo óptico *Optical Adhesive Film* (Applied Biosystems) y posteriormente se centrifugó durante 1 minuto a 1500 rpm. La reacción se llevó a cabo en el termociclador *ViiA7* (Applied Biosystems) y se siguió el siguiente protocolo de amplificación: 20 segundos a 95 °C y 45 ciclos de 1 segundo a 95 °C y 20 segundos a 60 °C.

Gen	Sonda <i>Taqman</i>
<i>Hmbs</i>	Mm00660262_g1
<i>Vhl</i>	4331348 Assay ID: AIMSITP

**Tabla 25. Sondas *Taqman* usadas para qPCR.** Referencia de las sondas *Taqman* empleadas para medir el nivel de expresión de ARNm por qPCR.



## 6.7. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

### 6.7.1. Extracción de proteínas en células de microglía

A las células de microglía de los cultivos primarios se les retiró el medio de cultivo y se homogeneizaron mediante la adición de 350 µl de *TRIzol* a cada pocillo (en las placas de 6 pocillos). Se recogieron las muestras en microtubos y se siguió el protocolo descrito en el apartado 6.4.1 de materiales y métodos (Extracción de ARN en microglía de cultivo primario) hasta la separación de las muestras en 3 fases. La fase inferior roja de fenol-cloroformo se recogió y se puso en un microtubo limpio al que se le añadió 525 µl de isopropanol (Sigma). Se incubaron las muestras durante 10 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se centrifugaron y a los pellets de proteínas se les realizaron 3 ciclos de lavado con guanidina (Sigma) 0,3 M y centrifugación. Posteriormente se lavaron con etanol 100% (Merk) y se dejaron secar, tras lo cual se disolvieron en *buffer laemmli* [Tris-HCl 62,5 mM (Sigma) a pH 6,8, SDS 1% (p/v) (Bio-Rad), glicerol 6,25% (v/v) (Sigma), azul de bromofenol 0,25 mg/ml (Amersham) y β-mercaptoetanol 1,25% (v/v) (Sigma) en H<sub>2</sub>O destilada] mediante incubación a temperatura ambiente durante 10 minutos, seguidos de una incubación a 50 °C durante 10 minutos. Tras la incubación fueron centrifugados a 4 °C para descartar las células no lisadas o restos celulares, y el sobrenadante se guardó a -20 °C hasta su uso.

### 6.7.2. Extracción de proteínas en células HEK-293T

A las células HEK-293T se les retiró el medio de cultivo, se lavaron con PBS frío y se homogeneizaron mediante la adición de 1 ml de *buffer Jie* [NaCl 100 mM (Sigma), Tris-HCl 20 mM (Sigma) a pH 7,4, MgCl<sub>2</sub> 5 mM (Sigma), Nonidet P-40 0,5% (v/v) (Sigma), inhibidor de proteasas sin EDTA 1x (Roche), endonucleasa 1:2000 (Sigma)] a cada placa (placas de 6 cm de diámetro). Se recogieron las muestras en microtubos y se incubaron durante 30 minutos en rotación a 4 °C. A continuación, se centrifugaron durante 15 minutos a 13000 rpm y 4 °C y el sobrenadante se recogió y guardó a -20 °C hasta su uso.

## 6.8. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

### 6.8.1. Cuantificación de proteínas de muestras procedentes de cultivos primarios de microglía

Para cuantificar la cantidad de proteína extraída a partir de las muestras procedentes de cultivos primarios de microglía, se utilizó el sistema *RCDC protein assay kit* (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello se hizo una dilución 1:10 de la proteína y a un volumen final de 25 µl de dicha dilución, se le añadieron 125 µl del Reactivo I (Bio-Rad). La mezcla se incubó





## MATERIALES Y MÉTODOS

durante 1 minuto a temperatura ambiente, tras lo cual se añadieron 125 µl del Reactivo II (Bio-Rad) y se centrifugó. El sobrenadante se descartó y el pellet se incubó durante 5 minutos con 127 µl del Reactivo A' [5 µl de Reactivo S (Bio-Rad) por cada 250 µl de Reactivo A (Bio-Rad)]. Posteriormente se añadió 1 ml de Reactivo B (Bio-Rad) y se incubaron las muestras durante 15 minutos, tras lo cual se midió su absorbancia a 750 nm en el espectrofotómetro *Du 640* (Beckman). Para la realización de la curva estándar se utilizó BSA (AppliChem) a concentraciones conocidas, y se consideraron aceptables coeficientes de correlación de  $R^2 > 0,98$ .

### 6.8.2. Cuantificación de proteínas de muestras procedentes de células HEK-293T

Para cuantificar la cantidad de proteína extraída a partir de las muestras procedentes de cultivos de células HEK-293T, se utilizó el sistema *Pierce 660 Protein Assay Reagent* (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello se usaron 10 µl de la proteína a los que se añadieron 150 µl del reactivo *Pierce 660 nm Protein Assay Reagent* (Thermo Scientific) y se incubaron las muestras durante 5 minutos, tras lo cual se midió su absorbancia a 660 nm. Para la realización de la curva estándar se utilizó BSA (Thermo Scientific) a concentraciones conocidas, y se consideraron aceptables coeficientes de correlación de  $R^2 > 0,98$ .

## 6.9. INMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS

Para inmunoprecipitar las proteínas procedentes de los cultivos de células HEK-293T se usaron perlas magnéticas anti-FLAG (Sigma). Se utilizaron 20 µl iniciales de perlas magnéticas para cada muestra, que se lavaron con *buffer Jie* dos veces para retirar todo el glicerol, y se resuspendieron en un volumen final de 40 µl para cada muestra. Los 40 µl se añadieron al extracto de proteínas, del que previamente se había guardado 100 µl como input, y se incubaron durante toda la noche en rotación a 4 °C. A continuación se realizaron 5 lavados con *buffer Jie*, se centrifugaron las muestras para retirar todo el sobrenadante y se añadió 50 µl del *buffer* de elución [Hidróxido de amonio 0,5 M (Sigma), EDTA 0,5 mM (Bio-Rad)] a cada muestra. Se incubaron durante 10 minutos en agitación a 1250 rpm y 4 °C, se centrifugaron las muestras y el sobrenadante se guardó en un microtubo limpio. Se volvió a añadir 50 µl del *buffer* de elución a las perlas magnéticas y se volvieron a incubar durante de 10 minutos en agitación a 1250 rpm y 4 °C. Se centrifugaron y el sobrenadante se añadió al microtubo anterior, al cual también se añadió 25 µl de *Trizma hydrochloride* 1 M pH 7,4 (Sigma) para neutralizar el pH.



## 6.10. WB

### 6.10.1. WB de muestras procedentes de cultivos primarios de microglía

Para la detección de las proteínas de interés de una mezcla compleja por su peso molecular, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE; del inglés, *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) (Sambrook et al., 1989). Se utilizó para ello el sistema *Mini-PROTEAN II Cell* (Bio-Rad).

En todos los casos, se partió de 20 µg de extracto total de proteína, previamente desnaturalizada mediante una incubación de 5 minutos en *buffer laemmli* en un volumen final de 18 µl a una temperatura de 95 °C. La concentración de poliacrilamida (40% *Acrylamide/Bis Solution*, 29:1, 3,3% C, Bio-Rad) de la parte separadora del gel fue del 10% en el caso de los WBs contra HIF1α y del 12% en los casos de los WBs contra FOXO3. En ambos casos se usó como control de carga la proteína β-ACTINA. La electroforesis se llevó a cabo a 200 voltios durante 1 hora aproximadamente en *buffer* de electroforesis a pH 6,8 [Tris-HCl 2,5 mM (Sigma), glicina 19,2 mM (Sigma), SDS 0,01% (p/v) (Bio-Rad) en H<sub>2</sub>O destilada].

Una vez realizada la separación por electroforesis de las proteínas, estas se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF; del inglés, *polyvinylidene fluoride*) (Millipore) previamente activada con metanol (Merk) según las instrucciones del fabricante. Se utilizó un sistema de transferencia semi-seco (Sigma) durante 1 hora y media, en solución de transferencia [Tris-HCl 14,9 mM (Sigma), glicina 12 mM (Sigma), metanol al 20% (v/v) (Merk)]. El amperaje escogido dependió de la superficie de la membrana, en función del cálculo “cm<sup>2</sup> x 1”. Posteriormente, se procedió al bloqueo de las membranas durante 1 hora que se realizó en diferentes soluciones en función de la proteína que fuésemos a detectar.

- Solución de bloqueo para HIF1α y β-ACTINA: PBS 1x, suplementado con *Tween-20* (Sigma) al 0,1% (v/v) (PBS-Tween 0,1%) y leche desnatada en polvo (Hacendado) al 5% (p/v).
- Solución de bloqueo para FOXO3: Tampón tris salino (TBS; del inglés, *tris buffered saline*) 1x [Tris-HCl 15,2 mM (Sigma), Trizma base 4,6 mM (Sigma), NaCl 150,7 mM (Sigma) a pH 7,6], suplementado con *Tween-20* (Sigma) al 0,1% (v/v) (TBS-Tween 0,1%) y leche desnatada en polvo (Hacendado) al 5% (p/v).

Transcurrido este tiempo las membranas se incubaron durante toda la noche a 4 °C en solución de bloqueo junto con el anticuerpo primario anti-HIF1α (Cayman, Cat.# 10006421) a dilución 1:500 o anti-β-ACTINA (Abcam, Cat.# ab6276) a dilución 1:5000. En el caso del anticuerpo anti-FOXO3 (Cell Signaling, Cat.# 2497) en lugar de leche desnatada en polvo se usó BSA (AppliChem). A continuación se realizaron 4 lavados de 5 minutos cada uno con PBS-Tween



## MATERIALES Y MÉTODOS

0,1% (en el caso de las membranas incubadas con los anticuerpos anti-HIF1 $\alpha$  y anti- $\beta$ -ACTINA) o con TBS-Tween 0,1% (en el caso de las membranas incubadas con el anticuerpo anti-FOXO3), después de lo cual se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa anti-IgG conejo (Thermo Scientific, Cat.# 31460) o anti-IgG ratón (GE Healthcare, Cat.# NA931) a dilución 1:10000 durante 1 hora a temperatura ambiente en las mismas soluciones en las que se realizaron los lavados. Tras la incubación se volvieron a realizar 4 lavados de 5 minutos cada uno en las mismas soluciones, y posteriormente se procedió al revelado por quimioluminiscencia utilizando el kit *Clarity Western ECL Substrate* (Bio-Rad) para FOXO3 y  $\beta$ -ACTINA y el kit *Clarity Max ECL Substrate* (Bio-Rad) para HIF1 $\alpha$ , según las indicaciones del fabricante, y como lector se usó *ChemiDoc Touch Imaging System* (Bio-Rad).

Las imágenes adquiridas se cuantificaron con el *software Image Lab* (Bio-Rad) y la carga de proteína se obtuvo tras la normalización con respecto a la proteína usada como control,  $\beta$ -ACTINA, del carril correspondiente.

### 6.10.2. WB de muestras procedentes de células HEK-293T

Para la detección de las proteínas de interés de una mezcla compleja por su peso molecular, se realizó SDS-PAGE (Sambrook et al., 1989). Se utilizó para ello el sistema *Mini-PROTEAN II Cell* (Bio-Rad).

En todos los casos se partió de 5  $\mu$ g de input y 50  $\mu$ g de proteína inmunoprecipitada, previamente desnaturalizada mediante una incubación de 5 minutos en *buffer laemmli* a una temperatura de 95 °C. Se usaron geles prefabricados (Bio-Rad) con una concentración de poliacrilamida del 8 al 16%. La electroforesis se llevó a cabo a 200 voltios durante 1 hora aproximadamente en *buffer* Tris-glicina-SDS 1x (Bio-Rad) a pH 8,3.

Una vez realizada la separación por electroforesis de las proteínas, estas se transfirieron a una membrana de PVDF previamente activada con metanol (Merk) según las instrucciones del fabricante. Se utilizó un sistema de transferencia semi-húmedo (Bio-Rad) durante 1 hora en solución Tris-glicina 1x (Bio-Rad) con metanol al 10% (v/v) (Merk). La transferencia se llevó a cabo a 100 voltios. Posteriormente, se procedió al bloqueo de las membranas durante 30 minutos que se realizó en PBS-Tween 0,1% suplementado con leche desnatada en polvo al 5% (p/v).

Transcurrido este tiempo las membranas se incubaron durante toda la noche a 4 °C en solución de bloqueo junto con el anticuerpo primario anti-V5 Tag (Cell Signaling, Cat.# 13202) a dilución 1:1000 o durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo anti-FLAG conjugado a peroxidasa (Sigma, Cat.# A8592) a dilución 1:2000. A continuación se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS-Tween 0,1%, después de lo cual las membranas previamente



incubadas con el anticuerpo anti-V5 Tag se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa anti-IgG conejo (DAKO, Cat.# P0399) a dilución 1:2000 durante 1 hora a temperatura ambiente en solución de bloqueo. Tras la incubación se volvieron a realizar 3 lavados de 10 minutos en PBS-Tween 0,1%, y posteriormente se procedió al revelado por quimioluminiscencia utilizando el kit *SuperSignal West Dura* (Thermo Scientific) para FLAG y el kit *SuperSignal West Femto* (Thermo Scientific) para V5, según las indicaciones del fabricante, y como lector se usó *ChemiDoc Touch Imaging System* (Bio-Rad).

## 6.11. ESTUDIO TRANSCRIPTÓMICO

### 6.11.1. Arrays de expresión

Para el estudio transcriptómico de la microglía procedente de cultivos primarios, de la microglía aislada por FACS así como de las muestras de corteza, se utilizaron arrays de hibridación de *Affymetrix* (Thermo Scientific). El uso de arrays de hibridación permite, de manera rápida y simple, analizar una extensa cobertura de genes a lo largo de todo el transcriptoma, lo que genera un rendimiento y una confianza de datos bastante elevada, junto con un *software* de análisis de datos flexible.

En todos los casos se extrajo el ARN de las muestras tal y como se describió en el apartado 6.4 de materiales y métodos (extracción de ARN), y tras la cuantificación y el análisis de su calidad mediante el uso del bionalizador *Agilent 2100* (Agilent), se usaron solo aquellas muestras de ARN que tenían un número de integridad de ARN (RIN; del inglés, *RNA integrity number*) superior a 7. Para las muestras de microglía procedentes de cultivos primarios así como para las muestras de cortezas, el ARN se amplificó y marcó usando *GeneChip WT PLUS Reagent Kit* (Thermo Scientific). La amplificación se realizó usando 100 ng del ARN total siguiendo las instrucciones del fabricante. En el caso del ARN procedente de las muestras de microglía aislada mediante FACS, este se amplificó y marcó usando todo el ARN extraído como material de partida mediante el uso de *GeneChip WT Pico Reagent Kit* (Thermo Scientific) y siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADNc amplificado se cuantificó, fragmentó y marcó para la hibridación en el *GeneChip Mouse Transcriptome 1.0 Array* (Thermo Scientific) usando 5,5 µg de producto de ADNc monocatenario y siguiendo los protocolos descritos en el manual del usuario.

El lavado, marcaje (*GeneChip Fluidics Station 450*; Thermo Scientific) y escaneo (*GeneChip Scanner 3000*; Thermo Scientific) se llevaron a cabo siguiendo también los protocolos descritos en el manual del usuario correspondiente. Los datos brutos del *software* de extracción *Expression Console* (Thermo Scientific) se importaron al programa estadístico "R" (RStudio Inc.) utilizando el paquete *LIMMA / Bioconductor* (Ritchie et al., 2015). La calidad de los datos se evaluó utilizando



## MATERIALES Y MÉTODOS

el paquete *Array Quality Metrics* (Kauffmann et al., 2009). Los datos se normalizaron utilizando el método *Robust Multi-Array* y el análisis de expresión diferencial se realizó mediante el paquete *LIMMA / Bioconductor* (Phipson et al., 2016).

### 6.11.2. Análisis de expresión global de genes

El perfil transcripcional de la microglía de los modelos murinos *APP-PSEN1* (Orre et al., 2014a) y *5xfAD* (Wang et al., 2015), se obtuvo de la base de datos *Gene expression omnibus* (GEO) (Edgar, 2002) del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI; del inglés, *National Center for Biotechnology Information*). Para identificar procesos biológicos subyacentes en la microglía de los modelos murinos *5xfAD*, *APP<sub>751SL</sub>*, *MAPT<sup>p.P301S</sup>*, envejecimiento, *APP-PSEN1* y *Elgn3<sup>-/-</sup>*; *APP-PSEN1*, así como en la corteza de los modelos murinos *APP-PSEN1* y *Elgn3<sup>-/-</sup>*; *APP-PSEN1*, se usó el GSEA (Subramanian et al., 2005). Se analizó el enriquecimiento o empobrecimiento de GSs a partir del conjunto de datos de la categoría “*Biological Processes C5*” versión 6.2 (para el análisis del objetivo 1) o versión 5.1 (para el análisis del objetivo 2) o “*KEGG Pathway C2*” versión 5.1, según el análisis realizado y un conjuntos de genes personalizados que incluyen la “HMS”, el “MGnD” procedente de la DAM (Krasemann et al., 2017) y la “IFN- $\beta$ S” (Litvak et al., 2012).

El enriquecimiento de la HMS en contextos relacionados con el envejecimiento y la neurodegeneración, se testó en datos públicos de estudios de secuenciación de ARN (RNA-seq; del inglés, *RNA sequencing*) de ELA (Chiu et al., 2013) de la base de datos GEO de NCBI y envejecimiento (Hickman et al., 2013) de la base de datos Bioproyectos de NCBI (Vera-Álvarez et al., 2017). Estos datos se reanalizaron usando el *software miARma-seq* (Andrés-León et al., 2016). Brevemente, los archivos de lectura secuenciados sin procesar se sometieron a un análisis de calidad de la secuencia y se filtraron con el módulo *FASTQC*. Para cada muestra, se obtuvo el alineamiento con el módulo *TopHat* usando el módulo *Bowtie2*. En este punto se generaron los archivos alineados *BAM*. Con el fin de cuantificar las lecturas mapeadas con el material genómico de referencia, se implementó el algoritmo *featureCounts*.

### 6.11.3. TFEA

Para estudiar los factores de transcripción que se encuentran enriquecidos en la microglía del modelo murino *APP-PSEN1*, se empleó la herramienta *TFEA.Chip* (Puente-Santamaría & Del Peso, 2018). El TFEA de conjuntos de datos de ChIP-seq, usa datos experimentales proporcionados por el consorcio ENCODE (ENCODE Project Consortium, 2012), así como conjuntos de datos aportados a la base de datos GEO (Barrett et al., 2013; Edgar, 2002) por laboratorios individuales, que representan los sitios de unión de factores de transcripción no analizados por ENCODE. En total se emplearon para el análisis 1122 conjuntos de datos de ChIP-seq que incluyen 331 factores de transcripción humanos diferentes.



## 6.12. ANÁLISIS BIOENERGÉTICO

Se usó el analizador *Agilent Seahorse XFp* (Agilent) para realizar un análisis bioenergético de las células de microglía de cultivos primarios. Las células de microglía primaria 24 horas después de su aislamiento se despegaron de las placas de cultivo mediante tripsinización y se sembraron en miniplacas de cultivos celular XFp (Agilent), previamente tratadas con poli-D-lisina (Sigma), a una concentración de  $3,5 \times 10^4$  células/pocillo en un volumen de 80 µl/pocillo, y se mantuvieron a 37 °C en un incubador humidificado con un 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas en su medio. El medio se cambió por medio condicionado recogido en los días previos del cultivo y almacenado a 4 °C hasta su uso, y las células se expusieron a condiciones de normoxia (21% O<sub>2</sub>) o de hipoxia (1% O<sub>2</sub>) durante 24 horas. El cartucho sensor se hidrató mediante la adición de 200 µl de *XF Calibrant Solution* (Agilent) a cada pocillo y 400 µl a los fosos situados a ambos lados, y se incubó durante toda la noche a 37 °C en un incubador sin control del CO<sub>2</sub>.

Tras 24 horas las células se lavaron dos veces con el medio usado para el ensayo, *XF Base Medium* (Agilent) suplementado con glucosa 17,5 mM (Sigma), L-glutamina 4,5 mM (Gibco), piruvato 0,5 mM (Sigma) y hepes 5 mM (Gibco). Se dejó un volumen final de 180 µl/pocillo y las células se incubaron durante 1 hora a 37 °C en un incubador sin control del CO<sub>2</sub>. Para el ensayo de estrés mitocondrial se cargaron en los puertos correspondientes del cartucho sensor oligomicina 20 µM (Agilent), carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP) 20 µM (Agilent) y rotenona/antimicina A 10 µM (Agilent), que se liberaron de forma secuencial. Para el ensayo glucolítico se cargaron de forma similar en el cartucho sensor rotenona/antimicina A 10 µM (Agilent), 2-deoxiglucosa (2-DG) 500 mM (Agilent) y medio *XF Base* suplementado, y se les cambió el medio a las células por medio *XF Base* suplementado fresco antes de proceder a realizar el ensayo.

Tras la calibración del cartucho sensor, la tasa de consumo de O<sub>2</sub> (OCR; del inglés, *oxygen consumption rate*), la tasa de acidificación extracelular (ECAR; del inglés, *extracellular acidification rate*) y la tasa del flujo de protones (PER; del inglés, *proton efflux rate*), se midió cada 6 minutos durante 72 minutos y los correspondientes compuestos se inyectaron de manera secuencial a intervalos de 18 minutos. OCR, ECAR y PER se calcularon de manera automática mediante el uso del *software Seahorse XFp* (Agilent). Todos los datos se normalizaron con respecto al contenido de proteínas, que se recogieron al finalizar el ensayo mediante la adición a los pocillos de 25 µl de *buffer laemmli* y su posterior cuantificación mediante el método explicado en el apartado 6.8.1 de materiales y métodos (Cuantificación de proteínas de muestras procedentes de cultivos primarios de microglía).





## MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.13. TINCIÓN INMUNOFLOUORESCENTE PARA IBA1, DAPI Y TIO-S

Los cerebros fueron extraídos de ratones perfundidos con PBS e inmediatamente después de su extracción se fijaron durante toda la noche con paraformaldehído al 4% (p/v) (Sigma) a 4 °C, tras lo cual incluyeron en parafina en un procesador de tejidos (Leica) que realiza automáticamente la deshidratación pasando por una serie de alcoholes de gradación creciente, xilol y parafina según el siguiente protocolo: 45 minutos en etanol 70%, 45 minutos en etanol 96%, 1 hora en etanol 96%, 2 ciclos de 1 hora en etanol 100%, 45 minutos en xileno, 1 hora en xileno y 3 ciclos de 2 horas en parafina. Al día siguiente los cerebros incluidos se montaron en bloques. El tejido se cortó en secciones coronales de 20 µm de grosor utilizando un microtomo (Leica). Tras el corte el tejido se secó toda la noche en una estufa a 37 °C y se almacenó a temperatura ambiente hasta su uso.

Las secciones de cerebros se desparafinaron y se rehidrataron en una serie decreciente de alcoholes según el siguiente protocolo: 2 lavados de 5 minutos en xilol, 2 lavados de 5 minutos en etanol 100%, 2 lavados de 5 minutos en etanol 96%, 1 lavado de 5 minutos en etanol 70% y 3 lavados de 5 minutos en H<sub>2</sub>O destilada. Tras la hidratación del tejido se incluyó un paso de desenmascaramiento antigénico en un sistema automatizado (2100 Retriever) en tampón de citrato de sodio [Citrato trisódico dihidratado 10 mM (Sigma) a pH 6, Tween-20 0,05% (v/v) (Sigma)]. Después se realizaron 3 lavados de 5 minutos en PBS, seguidos de permeabilización en PBT-0,3% (Tritón X-100 (Sigma) al 0,3% (v/v) en PBS) durante 10 minutos. Se continuó con 2 lavados de 5 minutos en PBT-0,1% (Tritón X-100 (Sigma) al 0,1% (v/v) en PBS), un bloqueo de 1 hora en solución de bloqueo [Suero de cabra al 10% (v/v) (Gibco), BSA 1% (p/v) (AppliChem) en PBT-0,1%] y una incubación con el anticuerpo primario policlonal anti-IBA (Wako, Cat.# 019-19741) a 1:500 en solución de bloqueo durante toda la noche a 4 °C. Tras 3 lavados de 5 minutos con PBT-0,1%, los cortes de cerebros se incubaron durante 2 horas con el anticuerpo secundario anti-IgG conejo conjugado con el fluorocromo Alexa-488 (Invitrogen, Cat.# A11034) o con el anticuerpo anti-IgG conejo conjugado con el fluorocromo Alexa-568 (Invitrogen, Cat.# A11011) a concentración 1:800 en PBT-0,1%. A continuación se realizaron 2 lavados con PBS y solo en los casos correspondientes se realizó la tinción con Tio-S (Sigma) al 0,005% (p/v) en PBS durante 8 minutos en oscuridad, seguida de 3 lavados de 10 segundos en etanol 50% (v/v) (Merk) y 3 lavados de 10 segundos en H<sub>2</sub>O destilada. Tras 2 lavados con PBS en todos los casos, los núcleos se tiñeron con DAPI (Sigma) a 1:1000 en PBS durante 5 minutos, seguido de 2 lavados de 5 minutos con PBS y montaje en medio acuoso *Fluoromont-G* (Southern biotech). Las imágenes fueron tomadas en el microscopio de fluorescencia *Olympus BX-61*.





## 6.14. INMUNODETECCIÓN PARA *EVANS BLUE*

Para el análisis de *Evans blue*, el cerebro de los animales perfundidos tal y como se explicó en el apartado 6.1.1 de materiales y métodos (Mantenimiento y cuidados generales), se retiró y se fijó durante toda la noche en la solución de fijación [Paraformaldehído 4% (p/v) (Sigma), glutaraldehído 0,05% (v/v) (Sigma) en PBS] a 4 °C. El cerebro se sumergió en una solución de sacarosa al 30% (p/v) (Sigma) en PBS durante 48 horas a 4 °C para crioprotegerlo y posteriormente se incluyó en OCT (Tissue-Tek). El tejido se cortó en secciones coronales de 40 µm de grosor utilizando un criostato (Leica) y la inmunotinción se realizó con las rodajas en flotación y siguiendo el protocolo descrito por Wälchli y colaboradores (Wälchli et al., 2014). Las rodajas se post-fijaron en la solución de fijación durante 10 minutos y tras ello se procedió al desenmascaramiento antigénico mediante la incubación en la solución de NH<sub>4</sub>Cl 50 mM (Sigma) en PBS durante 30 minutos en agitación a 100 rpm, seguido de una incubación de 5 minutos a 80 °C en agitación en glicina 50 mM (Sigma) en Tris-HCl a pH 8 y finalmente en un *buffer* de CaCl<sub>2</sub> [CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM (Sigma), MgCl<sub>2</sub> 0,1mM (Sigma), MnCl<sub>2</sub> 0,1 mM (Sigma) en PBS a pH 6,8] mediante 3 ciclos de 30 segundos de calentamiento en microondas a 600 vatios. Posteriormente se permeabilizaron las rodajas mediante la incubación a temperatura ambiente en agitación en PBT-0,3%, tras lo cual se procedió a la incubación con el anticuerpo primario correspondiente (dato no relevante puesto que no se muestra) en la solución de bloqueo [*Buffer* de CaCl<sub>2</sub>, 2% suero de cabra (v/v) (Gibco), 0,05% Tritón X-100 (v/v) (Sigma)] durante 72 horas a 4 °C en agitación. Después se realizaron 3 lavados de 10 minutos en PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (dato no relevante puesto que no se muestra) en la solución de bloqueo durante toda la noche a 4 °C en agitación. Tras esto se realizaron 3 lavados de 10 minutos en PBS y se marcaron los núcleos con DAPI (Sigma) a 1:1000 en PBS durante 10 minutos. Se realizaron 2 lavados de 5 minutos en PBS y se procedió al montaje de las rodajas en portas con medio acuoso *Fluoromont-G* (Southern Biotech). Las imágenes fueron tomadas en el microscopio confocal *Leica SP2*.

## 6.15. INMUNODETECCIÓN PARA HIPOXIA

Para el análisis de hipoxia se les inyectó a los ratones intraperitonealmente 60 mg/kg de pimonidazole HCl disuelto en solución salina (Raleigh et al., 1999) y se sacrificaron 45 minutos después de la inyección. Se extrajeron los cerebros, se congelaron en nitrógeno líquido y se cortaron en secciones coronales de 20 µm usando el criostato (Leica). Las secciones se fijaron en acetona (Panreac) fría durante 10 minutos, tras lo que se realizaron 2 lavados de 2 minutos en PBS y se incubaron durante toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario policlonal anti-



## MATERIALES Y MÉTODOS

pimonidazole (HPI, Cat.# HP Pab2627) a dilución 1:20 en PBS con BSA (AppliChem) al 0,1% (p/v) y *Tween-20* (Sigma) al 0,1% (v/v). Tras la incubación se realizaron 2 lavados de 2 minutos en PBS y las secciones se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a peroxidasa (Dako, Cat.# K4011), tras lo que se llevó a cabo la reacción química de visualización del anticuerpo con el kit de revelado de la inmunoperoxidasa (Master diagnóstica, Cat.# MA-001811QK) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizaron 2 lavados en PBS y posteriormente la tinción con Tio-S (Sigma) al 0,005% (p/v) en PBS durante 8 minutos en oscuridad, tras lo cual se realizaron 3 lavados de 10 segundos en etanol (Merk) al 50% (v/v) y 3 lavados de 10 segundos en H<sub>2</sub>O destilada seguidos de un lavado de 5 minutos en PBS. Posteriormente se procedió a su montaje en el medio acuoso *Fluoromont-G* (Southern Biotech). Se usaron como controles negativos ratones WT inyectados con pimonidazole HCl así como ratones *APP-PSEN1* sin inyectar, y como control positivo se usaron muestras de riñón. Las imágenes fueron tomadas en el microscopio *Olympus BX61*.

## 6.16. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Las imágenes mediante microscopía electrónica se realizaron en colaboración con el grupo de la Dra. Antonia Gutiérrez (Universidad de Málaga). A los ratones se les realizó perfusión intracardiaca con una solución compuesta por PBS y heparina al 1% a pH 7,4, seguida de una solución fijadora [Glutaraldehído 2,5% (v/v) (Sigma), paraformaldehído 2% (p/v) (Sigma)] en tampón fosfato (PB, del inglés, *Phosphate buffer*) [NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1M (Sigma), NaHPO<sub>4</sub> 0,1M (Sigma), pH 7,4]. Se extrajeron los cerebros y se fijaron en la misma solución fijadora durante toda la noche a 4 °C, tras lo cual se realizaron varios lavados con PB y se cortaron en secciones coronales de 100-150 µm en un vibratomo. Posteriormente las secciones se fijaron en tetróxido de osmio al 2% (Electron Microscopic Science) en PB y se embebieron en *Araltide* (EMS, EE.UU.) Las áreas seleccionadas se cortaron en secciones ultrafinas, se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo y se examinaron con un microscopio electrónico *JEOL JEM 1400*.

## 6.17. ISH COMBINADA CON INMUNOFLUORESCENCIA

Los cerebros fueron extraídos de ratones perfundidos con PBS e inmediatamente después de su extracción fueron fijados durante toda la noche con paraformaldehído al 4% (p/v) (Sigma) a 4 °C, tras lo cual se sumergió el tejido en una solución de sacarosa al 30% (p/v) (Sigma) en PBS durante 24 horas a 4 °C para crioprotegerlo. Al día siguiente se incluyó en medio OCT (Tissue-Tek) y se almacenó a -80 °C. El tejido se cortó en secciones coronales de 20 µm de grosor utilizando un criostato (Leica) y los cortes se almacenaron a -80 °C hasta su uso.



## MATERIALES Y MÉTODOS

Para detectar las moléculas de ARNm de *Hif1a* y *Egln3*, se usó el kit de detección (marrón) de *RNAscope 2.5 HD* (Advanced Cell Diagnostics) con las sondas de *Hif1a* (Advanced Cell Diagnostics, Cat.# 313821) o *Egln3* (Advanced Cell Diagnostics, Cat.#434931) y se siguieron las instrucciones del fabricante para tejido congelado, usando para ello un horno de *HybEZ* (Advanced Cell Diagnostics). Los cortes se lavaron durante 5 minutos en PBS tras lo cual se neutralizó la peroxidasa endógena mediante la adición de 3 gotas por corte de peróxido de hidrógeno al 3% (Advanced Cell Diagnostics) durante 10 minutos. Se lavó con H<sub>2</sub>O destilada y se procedió al desenmascaramiento antigénico con la incubación de los cortes durante 5 minutos en la solución *Target retrieval* (Advanced Cell Diagnostics) a una temperatura constante de 100 °C, después se lavó con H<sub>2</sub>O destilada y luego con etanol 100%, tras lo cual se dejó secar y se dibujó una barrera con el rotulador hidrofóbico *Immedge* (Advanced Cell Diagnostics) alrededor de cada sección.

Una vez seco se añadió a cada sección una gota de *Protease Plus* (Advanced Cell Diagnostics) y se incubaron en el horno a 40 °C durante 30 minutos, tras lo cual se realizaron 2 lavados en H<sub>2</sub>O destilada. Después se añadió una gota de la sonda correspondiente, *Hif1a* o *Egln3*, previamente calentada y se incubaron en el horno a 40 °C durante 2 horas, tras lo cual se realizaron 2 lavados en solución *Wash buffer* (Advanced Cell Diagnostics) y se dejaron durante toda la noche en solución de citrato de sodio salino a concentración 5x y pH 7 [NaCl 0,75 M (Sigma), citrato sódico dihidratado 75 mM (Sigma)].

A continuación, se realizaron 2 lavados de 2 minutos en solución *Wash buffer* (Advanced Cell Diagnostics) y se procedió a la amplificación de la señal añadiendo 1 gota de los siguientes compuestos e incubando durante el tiempo indicado según el siguiente protocolo: *Amp 1* (Advanced Cell Diagnostics) 30 minutos a 40 °C, *Amp 2* (Advanced Cell Diagnostics) 15 minutos a 40 °C, *Amp 3* (Advanced Cell Diagnostics) 30 minutos a 40 °C, *Amp 4* (Advanced Cell Diagnostics) 15 minutos a 40 °C, *Amp 5* (Advanced Cell Diagnostics) 30 minutos a temperatura ambiente para la sonda de *Hif1a* y 40 minutos para la sonda de *Egln3* y *Amp 6* (Advanced Cell Diagnostics) 15 minutos a temperatura ambiente. Entre cada incubación se realizaron 2 lavados de 2 minutos en *Wash buffer* (Advanced Cell Diagnostics).

Se mezcló igual volumen de las soluciones *BROWN-A* y *BROWN-B* (Advanced Cell Diagnostics), se añadió 30 µl de la mezcla a cada corte y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente para la sonda *Hif1a* y 15 minutos para la sonda de *Egln3*, tras lo que se lavaron los cortes con PBS y se incubaron durante 10 minutos en solución PBT-0,3%. Posteriormente se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo primario policlonal anti-IBA1 (Wako; Cat# 019-19741) a 1:500 en solución PBT-0,05% con suero de cabra al 2% (v/v) (Gibco) durante toda la noche a 4 °C. Tras la incubación se realizaron 3 lavados de 5 minutos en PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG conejo conjugado con el fluorocromo Alexa-488 (Invitrogen, Cat.# A11034)



## MATERIALES Y MÉTODOS

durante 1 hora a temperatura ambiente en la misma solución que el anticuerpo primario. A continuación, se realizó un lavado de 5 minutos en PBS y se marcaron los núcleos con DAPI (Sigma) a 1:1000 en PBS durante 10 minutos, tras lo cual se lavaron durante 5 minutos en PBS. Posteriormente, se procedió a su montaje en el medio acuoso *Fluoromont-G* (Southern Biotech). Las imágenes fueron tomadas en el microscopio confocal *Leica SP2*.

### 6.18. CUANTIFICACIÓN DE VASOS PERFUNDIDOS

Se usaron imágenes de confocal en plano XY que contenían placas de A $\beta$  centradas e imágenes de regiones cerebrales adyacentes sin placas. Se dibujó una circunferencia de 100  $\mu$ m de diámetro en el centro de cada imagen y el umbral se ajustó para detectar el canal blanco (633 nm) con *Fiji* (v.2.0.0), la imagen se invirtió y se cuantificó el área ocupada por los vasos usando el mismo *software*.

### 6.19. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las muestras con un  $n \geq 9$  fueron evaluadas para estudiar si su distribución era normal o no mediante la prueba de normalidad de *D'Agostino y Pearson*. Las muestras que no seguían una distribución normal se analizaron usando test no paramétricos. Las muestras con un  $n < 9$  se analizaron mediante el uso de test paramétricos. Las comparaciones entre dos grupos se realizaron usando la prueba *t* de *Student* no pareada (para datos distribuidos normalmente), excepto para las imágenes emparejadas de regiones adyacentes en el análisis de perfusión y para la medida de expresión del ARNm en las muestras de cultivos primarios de microglía de ratones *Cx3cr1-Cre::ERT2; Hif1a<sup>Flox/Flox</sup>* tratados con DMOG, TMX o ambos, que se usó la prueba *t* de *Student* pareada, o la prueba *Mann Whitney* (para datos no distribuidos normalmente). Las comparaciones entre más de dos grupos se realizaron con ANOVA seguido de la prueba de *Tukey*. Los datos se representan como la media  $\pm$  error estándar de la media. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando se obtiene un  $p < 0,05$ , y se muestra el nivel de significación de la siguiente manera:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) o  $p < 0,001$  (\*\*\*). Los análisis estadísticos y los gráficos se realizaron en *GraphPad Prism* versión 6.0 (GraphPad Inc.).



## SUMMARY

ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**000008745e2000018471**

CSV

**GEISER-8bff-daf6-0743-4697-b100-1dc0-5d4b-77e1**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular**



GEISER-8bff-daf6-0743-4697-b100-1dc0-5d4b-77e1

ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**000008745e2000018471**

CSV

**GEISER-8bff-daf6-0743-4697-b100-1dc0-5d4b-77e1**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular**



GEISER-8bff-daf6-0743-4697-b100-1dc0-5d4b-77e1

## 7. SUMMARY

### 7.1. INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is the most common chronic neurodegenerative disease and is considered the leading cause of dementia (Reitz & Mayeux, 2014). At the neuropathological level, AD is characterized by the presence of amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) plaques and neurofibrillary tangles (NFTs). In addition, neuropil threads, dystrophic neurites, associated astrogliosis and microglial activation are seen, and cerebral amyloid angiopathy frequently coexists (Serrano-Pozo et al., 2011). Around 5% of AD cases are caused by rare, fully penetrant mutations in three different genes, the amyloid precursor protein (*APP*) and the presenilins 1 and 2 (*PSEN1* and *PSEN2*). This variant of the disease is known as familial AD. However, in most cases AD appears sporadically and experts believe that AD, like other common chronic diseases, develops as a result of multiple risks factors such as age, the presence of the  $\epsilon 4$  allele of the gene coding for apolipoprotein E (APOE), genetic polymorphisms in many other genes and modifiable risk factors that converge in altering the vascular system and/or reducing the availability of oxygen (O<sub>2</sub>) and nutrients (Alzheimer's Association, 2016; Bertram et al., 2008; Chouraki & Seshadri, 2014; Livingston et al., 2017; Pimenova et al., 2018; Zlokovic, 2011). Although the causes of disease development are different, both variants of the disease share the same symptoms and histopathological lesions.

Microglia are the macrophages of the central nervous system (CNS) and these cells are intimately involved in brain homeostasis (Ginhoux & Prinz, 2015), participating in the regulation of brain development, maintenance of neural networks and repair of lesions (Colonna & Butovsky, 2017). Dysregulation of their functions results in an imbalance that initiates or propagates neurodegeneration (Hickman et al., 2018). Both, aging and neurodegeneration induce a very similar microglia transcription profile, decreasing the expression of homeostatic genes and increasing the expression of common genes found in disease associated microglia (DAM) and that are known as the microglial neurodegenerative phenotype (MGnD) (Holtman et al., 2015; Keren-Shaul et al., 2017; Krasemann et al., 2017; Sala-Frigerio et al., 2019).

Genome wide association studies (GWAS) show a role of microglia in AD. Mutations in several microglial genes were associated with an increased risk of suffer the disease (Lambert et al., 2013). In AD patients and AD animal models, microglial cells accumulate around the A $\beta$  plaques, where their density is 2 to 5 times higher than in the cerebral parenchyma (Frautschy et al., 1998). The chronic defensive activity of innate immune cell clusters generates tissue hypoxia (inflammatory hypoxia), a consequence of the increased metabolism -to fulfill the defensive





## SUMMARY

energetic and biosynthetic cost– and reduced O<sub>2</sub> and nutrient supply –due to local alteration of blood vessels (De Bock et al., 2009; Eltzschig & Carmeliet, 2011). Interestingly, the microvasculature is altered in the proximity of Aβ plaques both in the human AD brain and in Aβ-depositing mouse models (Kalaria, 1997; Kawai et al., 1990, 1992; Kouznetsova et al., 2006; Lee et al., 2005; Meyer et al., 2008; Nortley et al., 2019; Sengillo et al., 2013; Sweeney et al., 2018). Recent epidemiological studies have specifically attributed an increased risk of dementia and AD to diseases that occur with hypoxia (Rusanen et al., 2013; Yaffe et al., 2011). Several reports have indicated that cerebrovascular dysfunction is an early event of the pathogenesis of AD (Di Marco et al., 2015; Iturria-Medina et al., 2016).

Inadequate O<sub>2</sub> availability can lead to cellular dysfunction and even cell death. For this reason metazoans have developed systems to ensure adequate O<sub>2</sub> delivery to cells and tissues. In many cases these systems are regulated through the hypoxia inducible factor (HIF) pathway, an evolutionary conserved pathway which plays a fundamental role in this process (Kaelin & Ratcliffe, 2008; Semenza, 2011). Under well-oxygenated conditions HIFα becomes hydroxylated by members of the prolyl hydroxylase domain (PHD) family. Hydroxylation generates a binding site for the von Hippel Lindau (VHL) tumor suppressor protein and, as a result, HIFα is polyubiquitinated and subjected to proteasomal degradation. However, under hypoxia conditions HIFα stabilizes and binds to the HIFβ subunit, this complex binds to hypoxia response elements (HREs) and activates the transcription of its target genes (Kaelin & Ratcliffe, 2008; Schofield & Ratcliffe, 2004; Semenza, 2012b). In addition to the O<sub>2</sub>-dependent HIF activation pathway, there are other activation pathways that induce HIF under normoxia conditions, such as the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway (Dodd et al., 2015).

Previous studies carried out in our laboratory in the AD mouse model *APP-PSEN1*, showed that the number of Aβ associated microglia (AβAM) decreases under hypoxic conditions, and there is also an increase in the neurotoxicity associated to Aβ plaques. Furthermore, an increase in HIF1α expression levels was observed in human AD samples paralleling the progression of AD pathology (Heras-Garvín, 2015). The deletion of *Egln3*, a gene that encodes PHD3 protein, in AD mice, produced an increase in AβAM, a decrease in neurotoxicity, as well as an improvement in hyperactivity and short-term memory. For these reasons the main goal of this thesis is to study the role of HIF1 and PHD3, two key intermediaries of the hypoxia signaling pathway, in AD microglia.



## 7.2. RESULTS AND DISCUSSION

### 7.2.1. Objective 1: HIF1 in AD microglia

Increasing evidence indicates that the microglial defensive activity is required to halt the progression of AD. The function of microglia cells is to contain the expansion of A $\beta$  plaques and protect neurons from the local toxicity associated with plaques (Condello et al., 2015), since they are grouped and placed around A $\beta$  plaques, constituting the first defense barrier.

The area surrounding A $\beta$  plaques is hypoxic and hypoperfused. That could be caused by the chronic defensive activity of innate immune cells clustered around the plaques, since they consume a high amount of O<sub>2</sub> to fulfill the defensive energetic and biosynthetic cost (Eltzschig & Carmeliet, 2011) and also produce a local alteration of the blood vessels that affect their perfusion, morphology and vascular function (De Bock et al., 2009). Moreover, a higher expression of *Hif1a*, a well described modulator of the innate immune function (Eltzschig & Carmeliet, 2011; O'Neill & Pearce, 2016) and essential in hypoxia-mediated processes (Harris et al., 2014), was also observed in A $\beta$ AM. The hypoxia microglia signature (HMS) was defined and it was observed that its expression was increased in microglia in *APP-PSEN1* AD mouse model and that it was regulated by HIF1.

It has been proposed that a switch from oxidative phosphorylation (OXPHOS) towards anaerobic glycolysis in A $\beta$ AM *via* mTOR activation of the HIF pathway sustains defensive microglial responses (Ulland et al., 2017; Wendeln et al., 2018). We analyzed if A $\beta$  plaque-associated hypoxia and hypoperfusion contribute to A $\beta$ AM metabolism. For that purpose, the contribution of the HIF1 pathway to the microglial defensive responses was studied in two models of A $\beta$  plaque-deposition, *APP<sub>751</sub>SL* and *5xfAD* (Wang et al., 2015) *versus* three other mouse models where microglia do not cluster, a TAU overproducing model (*MAPT<sub>p.P301S</sub>*), an amyotrophic lateral sclerosis model (*SOD1<sub>p.G93A</sub>*, Chiu et al., 2013) and aged mice (Hickman et al., 2013). The results obtained indicated that, contrary to what was thought (Baik et al., 2019; Wendeln et al., 2018), the OXPHOS is a common feature of neurodegenerative disorder-associated microglia, while the simultaneous activation of HIF1-mediated gene expression and OXPHOS biogenesis is a peculiarity of A $\beta$ AM metabolism.

Although *in cellulo* microglial cells showed a classical hypoxic response, where they increased anaerobic glycolysis and decreased OXPHOS (Kaelin & Ratcliffe, 2008), mitochondrial biogenesis, predicted by the enrichment of the OXPHOS gene set (GS), was observed in A $\beta$ AM. They showed elongated mitochondria surrounded by rough endoplasmic reticulum which suggests that



## SUMMARY

mitochondria were generating, at least partially, the energy and components necessary for the synthesis of proteins and other compounds.

Under nutrient restriction, tumor cells reprogram their metabolism, moving from an anaerobic glycolytic metabolism to and oxidative metabolism, in order to overcome energy stress (Li et al., 2017). We speculate that a similar metabolic reprogramming was taking place in A $\beta$ AM, due to the peculiar characteristics of the blood vessels that were found in the immediate vicinity of A $\beta$  plaques, with a low perfusion and the high metabolic activity of the immune cells clustered around the plaques. The coexistence of a HIF1-mediated metabolism of glucose with a high OXPHOS is an extreme adaption to nutrient stress achieved by elongation of the mitochondria both in non-transformed (Gomes et al., 2011; Rambold et al., 2011) and tumor (Li et al., 2017) cells.

HIF1 overactivation by genetic hypoxia (VHL deficiency in adult microglia) in *APP-PSEN1* mouse model, produced an increase in HMS and a decrease in OXPHOS, which were accompanied by a decrease in the number of microglial cells as well as in the microglia surrounding A $\beta$  plaques. These data underlined the importance of OXPHOS in A $\beta$ AM for its proper functioning and cell survival.

### 7.2.2. Objective 2: PHD3 in AD microglia

*Egln3* gene has low expression levels in the homeostatic microglia (Zeisel et al., 2015). However, in the microglia of AD mouse models that accumulate A $\beta$ , *APP-PSEN1* and *5xfAD*, *Egln3* is one of the genes which increases more its expression (Orre et al., 2014a; Wang et al., 2015). *In situ* hybridization (ISH) combined with immunofluorescence showed that *Egln3* expression was confined to A $\beta$ AM. Previous studies carried out in the laboratory in the *APP-PSEN1* AD mouse model, showed that PHD3 deficiency improved the pathology associated to this disease (Sánchez-García, 2018).

As PHD3 is involved in a negative feedback loop leading to HIF1 $\alpha$  destabilization (Ginouvé et al., 2008), the possibility of a further augmentation of the HIF-mediated response in PHD3 deficient microglia was analyzed. However, the HMS was not enriched in PHD3 deficient AD microglia as well as increased expression of *Egln1* or *Egln2* was not observed as a compensatory mechanisms for the lack of *Egln3*, which seems to be context dependent by previous studies (Kiss et al., 2012; Swain et al., 2014).

The study of transcriptional changes in isolated microglia from PHD3 deficient AD mice showed an increase in the GS "MGnD", characteristic of the DAM, as well as gene regulation by A $\beta$  (Orre et al., 2014a; Wang et al., 2015) was potentiated, suggesting that PHD3 deficiency heightened the transcriptional response to A $\beta$ . A decreased expression of *Cd33*, gene involved in



phagocytosis restriction (Griciuc et al., 2013), was also observed. This is consistent with the data previously obtained in the laboratory which show an improvement of the AD pathology when *Egln3* is removed.

Several studies demonstrate the involvement of PHD3 in the regulation of metabolism (German et al., 2016; Miikkulainen et al., 2017; Taniguchi et al., 2013). Exploring the GSs that increase their expression when *Egln3* is eliminated in *APP-PSEN1*, it was observed a deep metabolic adjustment in microglia produced by the changes in the metabolism of certain amino acids, the peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) signaling pathway, as well as in genes implicated in glycolysis regulation. However, more studies are needed to understand the role of PHD3 in microglial cell metabolism in AD context.

Another of the changes observed was a strong repression of the interferon (IFN)  $\beta$  signature (IFN- $\beta$ S) genes, which control antiviral activity. A recent study reported the relevance of the IFN-regulated module in AD microglia (Friedman et al., 2018) something that we confirmed using gene set enrichment analysis (GSEA) in *APP-PSEN1* and *5xfAD*. The study carried out by Taylor and colleagues supports that blocking IFN-mediated signaling may be a therapeutic objective to limit the progression of AD since decrease in A $\beta_{42}$  peptide neurotoxicity is observed (Taylor et al., 2014), and other study shows that IFN-signaling inhibition produces a partial rescue of spatial learning as well as a decrease in CD33 expression (Minter et al., 2016).

*Egln3* was specifically eliminated in the adult *APP-PSEN1* microglial cells in order to verify if the changes observed were specific to microglia. It was probed that the expression of IFN- $\beta$ S genes was repressed, although the repression was not as strong as that observed in *Egln3* total knock-out mice.

FOXO3 acts as a repressor of the IFN-related module in macrophages (Litvak et al., 2012) and in our primary microglial cell cultures it was demonstrated that, as in macrophages, FOXO3 regulates the IFN- $\beta$ S genes. It has been described that PHD1 regulates FOXO3 stability by prolyl-hydroxylation (Zheng et al., 2014) and that PHD3 and FOXO3 physically interact (Rodríguez et al., 2016). In primary microglial cells it was observed that FOXO3 was regulated by the action of PHDs and that its degradation took place *via* proteasome. Experiments carried out in HEK-293T cells revealed that DMOG or MG132 dependent interaction occurred between FOXO3 and PHD3, although more studies are needed to know what kind of interaction occur between these two proteins and how is affecting FOXO3 regulation. These data suggested that the hypoxia-induced PHD3 expression leads to decreased stability of FOXO3 and de-repression of IFN- $\beta$ S in AD microglia.



## SUMMARY

In summary, we described an enriched HIF-dependent HMS expression in A $\beta$ AM that, concomitantly to hypoxia, produce a microglial depopulation of A $\beta$  plaques in AD patients and models with negative outcomes, including enhanced A $\beta$  spreading and neuronal damage. By contrast, deficiency of PHD3, a HIF1 target gene highly induced in AD microglia, resulted in previous experiments in increased plaque encapsulation and protection of neuronal and behavioral impairment that associates with silencing of antiviral responses that it could be regulated by FOXO3. Our findings suggest that modulation of the HIF/PHD3 pathway could be a novel therapeutic approach for AD to revert microglial dysfunction, improve A $\beta$  clearance, and prevent downstream neurodegeneration.

## 7.3. CONCLUSIONS

1. The area surrounding A $\beta$  plaques is hypoxic and hypoperfused and is characterized by *Hif1a* and *Egln3* expression in the A $\beta$ AM, whereas this expression is not observed in the microglia located far from plaques.
2. HIF1 is one of the main transcription factors which regulates A $\beta$ AM transcription and it is responsible for the regulation of the genes included in HMS, whose expression is strongly increased in AD microglia in comparison to microglia from other neurodegeneration or aging models.
3. Mitochondrial oxidative metabolism is a common feature of DAM and A $\beta$ AM, while the coexistence of oxidative metabolism with HIF1-mediated gene activation is a specific feature of A $\beta$ AM, which is not observed *in cellulo* when microglia is exposed to hypoxic conditions.
4. The metabolic state of A $\beta$ AM is achieved by HIF1 activation without induction of *Pdk1*, and the disruption of this metabolic adaptation by overactivation of HIF1, induces microglial dysfunction.
5. The absence of *Egln3* does not increase the expression of HMS in AD microglia and produces an enhancement of the transcriptional profile already present in AD microglia.
6. The absence of *Egln3* in *APP-PSEN1* mice produces metabolic changes in microglia and limits the antiviral response regulated by FOXO3 transcription factor.
7. The partial lack of *Egln3* in the adult *APP-PSEN1* microglia does not affect its proliferation or the CD45 membrane protein expression, and the repression of antiviral response observed is weaker than when *Egln3* is fully eliminated.



8. In microglia, FOXO3 is regulated by PHDs and degraded by the proteasome. Furthermore, interaction between FOXO3 and PHD3 dependent on DMOG or MG132 treatment is observed in HEK-293T cells, which indicates that PHD3 could regulate FOXO3 availability and consequently the antiviral response.

## 7.4. MATERIALS AND METHODS

In order to achieve the proposed objectives, different transgenic mouse models were used: *APP-PSEN1* (APP<sup>swe</sup>, PSEN1<sup>dE9</sup>), *APP<sup>751SL</sup>*, *MAPT<sup>p.P301S</sup>*, *Cx3cr1-Cre::ERT2*; *Hif1a<sup>Flox/Flox</sup>*, *Cx3cr1-Cre::ERT2*; *Hif1a<sup>Flox/Flox</sup>*; *APP-PSEN1*, *Cx3cr1-Cre::ERT2*; *Vhl<sup>Flox/-</sup>*, *Cx3cr1-Cre::ERT2*; *Vhl<sup>Flox/-</sup>*; *APP-PSEN1*; *Egln3<sup>-/-</sup>*, *Egln3<sup>-/-</sup>*; *APP-PSEN1*, *Cx3cr1-Cre::ERT2*; *Egln3<sup>Flox/Flox</sup>*, *Cx3cr1-Cre::ERT2*; *Egln3<sup>Flox/Flox</sup>*; *APP-PSEN1*, as well as *wild type* (WT) mice as a control. Primary microglial cell cultures from *Cx3cr1-Cre::ERT2*; *Hif1a<sup>Flox/Flox</sup>* and WT mice as well as HEK-293T cell line cultures were also used. Depending on the object of the study, the brain tissue, the primary microglial cultures or the HEK-293T cell line cultures were subjected to total ribonucleic acid (RNA) extraction, total protein extraction or immunohistochemical studies.

Microglial cells were isolated from the cortex of the adult mice at different ages by fluorescence activated cell sorting (FACS) (Orre et al., 2014b). To do this, the antibodies anti-CD11b, anti-CD45 and in some cases anti-CLEC7a were used. The total RNA was extracted and amplified in order to perform transcriptomic studies. Microarrays studies (Affymetrix, Thermo Scientific), GSEA and transcription factor enrichment analysis (TFEA) were realized. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reactions (qRT-PCRs) were performed in order to validate the expression of several genes. Furthermore, microarray studies and qRT-PCR from brain cortex samples from mice were also performed.

Primary microglial cell cultures were exposed to different treatments –hypoxia, dimethylxalylglycine (DMOG), MG132, tamoxifen (TMX) or small interfering RNA– and the total RNA and proteins were extracted. The RNA was used to perform microarrays studies as well as to measure the expression of specific genes by qRT-PCR. The expression of specific proteins were measured by western blot (WB). Primary microglial cells exposed to normoxia or hypoxia were also employed to perform a bioenergetics analysis using the Agilent Seahorse XFp (Agilent) analyzer.

HEK-293T cell line cultures were transfected with different plasmids and exposed to different treatments (DMOG or MG132) and the total proteins were extracted to perform immunoprecipitation assays.



## SUMMARY

Brain slices were used to explore microglia cells in mice that accumulate A $\beta$ , to measure the perfused vessel area in mice previously injected with Evans blue (Wälchli et al., 2014), to observe if there is hypoxia around A $\beta$  plaques in mice treated with pimonidazole (Raleigh et al., 1999), as well as to explore in which area and cells certain genes are expressed combining *in situ* hybridization with immunohistochemistry. Finally, electron microscopy was used to observe the mitochondrial morphology in microglial cells.

All experiments were analysed statistically, according to the required test in each case, by GraphPad Prism 6. We consider statistically significant differences with  $p < 0.05$ .





# BIBLIOGRAFÍA

ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**000008745e2000018471**

CSV

**GEISER-8bff-daf6-0743-4697-b100-1dc0-5d4b-77e1**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular**



GEISER-8bff-daf6-0743-4697-b100-1dc0-5d4b-77e1

ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**000008745e2000018471**

CSV

**GEISER-8bff-daf6-0743-4697-b100-1dc0-5d4b-77e1**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular**



GEISER-8bff-daf6-0743-4697-b100-1dc0-5d4b-77e1

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Abdullah, Z., Schlee, M., Roth, S., Mraheil, M. A., Barchet, W., Böttcher, J., Hain, T., Geiger, S., Hayakawa, Y., Fritz, J. H., Civril, F., Hopfner, K. P., Kurts, C., Ruland, J., Hartmann, G., Chakraborty, T., & Knolle, P. A. (2012). RIG-I detects infection with live listeria by sensing secreted bacterial nucleic acids. *EMBO Journal*, 31(21), 4153–4164.
- Acosta-Iborra, B., Elorza, A., Olazabal, I. M., Martín-Cofreces, N. B., Martín-Puig, S., Miró, M., Calzada, M. J., Aragonés, J., Sánchez-Madrid, F., & Landázuri, M. O. (2009). Macrophage oxygen sensing modulates antigen presentation and phagocytic functions involving IFN- $\gamma$  production through the HIF-1 $\alpha$  transcription factor. *The Journal of Immunology*, 182(5), 3155–3164.
- Alliot, F., Godin, I., & Pessac, B. (1999). Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Developmental Brain Research*, 117(2), 145–152.
- Alzheimer, A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift Psychiatrie Und Psychisch-Gerichtliche Medizin*, 64, 146–148.
- Alzheimer's Association (2016). 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's and Dementia*, 12(4), 459–509.
- Andrés-León, E., Núñez-Torres, R., & Rojas, A. M. (2016). miARma-Seq: A comprehensive tool for miRNA, mRNA and circRNA analysis. *Scientific Reports*, 6, 1–7.
- Appel, S. H., Zhao, W., Beers, D. R., & Henkel, J. S. (2011). The microglial-motoneuron dialogue in ALS. *Acta Myologica*, 30, 4–8.
- Arnold, S. E., Hyman, B. T., Flory, J., Damasio, A. R., & Van Hoesen, G. W. (1991). The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *Cerebral Cortex*, 1(1), 103–116.
- Arriagada, P. V., Growdon, J. H., Hedley-Whyte, E. T., & Hyman, B. T. (1992). Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology*, 42(3), 631–639.
- Arvanitakis, Z., Capuano, A. W., Leurgans, S. E., Bennett, D. A., & Schneider, J. A. (2006). Relation of cerebral vessel disease to Alzheimer's disease dementia and cognitive function in older persons: A cross-sectional study. *Lancet Neurology*, 15(9), 934–943.
- Augustinack, J. C., Schneider, A., Mandelkow, E. M., & Hyman, B. T. (2002). Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 103(1), 26–35.
- Baik, S. H., Kang, S., Lee, W., Choi, H., Chung, S., Kim, J. I., & Mook-Jung, I. (2019). A breakdown in metabolic reprogramming causes microglia dysfunction in Alzheimer's disease. *Cell Metabolism*, 30(3), 493–507.
- Baik, S. H., Kang, S., Son, S. M., & Mook-Jung, I. (2016). Microglia contributes to plaque growth by cell death due to uptake of amyloid  $\beta$  in the brain of Alzheimer's disease mouse model. *Glia*,



## BIBLIOGRAFÍA

- 64(12), 2274–2290.
- Barrett, T., Wilhite, S. E., Ledoux, P., Evangelista, C., Kim, I. F., Tomashevsky, M., Marshall, K. A., Phillippy, K. H., Sherman, P. M., Holko, M., Yefanov, A., Lee, H., Zhang, N., Robertson, C. L., Serova, N., Davis, S., & Soboleva, A. (2013). NCBI GEO: Archive for functional genomics data sets - Update. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), 991–995.
- Berra, E., Benizri, E., Ginouvès, A., Volmat, V., Roux, D., & Pouyssegur, J. (2003). HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 $\alpha$  in normoxia. *EMBO Journal*, 22(16), 4082–4090.
- Bertout, J. A., Patel, S. A., & Simon, C. M. (2010). The impact of O<sub>2</sub> availability on human cancer. *Nature Review Cancer*, 8(12), 967–975.
- Bertram, L., Lange, C., Mullin, K., Parkinson, M., Hsiao, M., Hogan, M. F., Schjeide, B. M. M., Hooli, B., DiVito, J., Ionita, I., Jiang, H., Laird, N., Moscarillo, T., Ohlsen, K. L., Elliott, K., Wang, X., Hu-Lince, D., Ryder, M., Murphy, A., ... Tanzi, R. E. (2008). Genome-wide association analysis reveals putative Alzheimer's disease susceptibility loci in addition to APOE. *American Journal of Human Genetics*, 83(5), 623–632.
- Bishop, T., Gallagher, D., Pascual, A., Lygate, C. A., de Bono, J. P., Nicholls, L. G., Ortega-Saenz, P., Oster, H., Wijeyekoon, B., Sutherland, A. I., Grosfeld, A., Aragones, J., Schneider, M., van Geyte, K., Teixeira, D., Diez-Juan, A., Lopez-Barneo, J., Channon, K. M., Maxwell, P. H., ... Ratcliffe, P. J. (2008). Abnormal sympathoadrenal development and systemic hypotension in PHD3-/- mice. *Molecular and Cellular Biology*, 28(10), 3386–3400.
- Blanchard, V., Moussaoui, S., Czech, C., Touchet, N., Bonici, B., Planche, M., Canton, T., Jedidi, I., Gohin, M., Wirths, O., Bayer, T. A., Langui, D., Duyckaerts, C., Tremp, G., & Pradier, L. (2003). Time sequence of maturation of dystrophic neurites associated with A $\beta$  deposits in APP/PS1 transgenic mice. *Experimental Neurology*, 184(1), 247–263.
- Blouin, C. C., Page, E. L., Soucy, G. M., & Richard, D. E. (2004). Hypoxic gene activation by lipopolysaccharide in macrophages: Implication of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Blood*, 103(3), 1124–1130.
- Bookheimer, S. Y., Strojwas, M. H., Cohen, M. S., Saunders, A. M., Pericak-Vance, M. A., Mazziotta, J. C., & Small, G. W. (2000). Patterns of brain activation in people at risk for Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine*, 343(7), 450–456.
- Bosco, M. C., Puppo, M., Santangelo, C., Anfosso, L., Pfeffer, U., Fardin, P., Battaglia, F., & Varesio, L. (2006). Hypoxia modifies the transcriptome of primary human monocytes: Modulation of novel immune-related genes and identification of CC-chemokine ligand 20 as a new hypoxia-inducible gene. *The Journal of Immunology*, 177(3), 1941–1955.
- Braak, H., & Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica*, 82, 239–259.
- Braak, H., Alafuzoff, I., Arzberger, T., Kretschmar, H., & Tredici, K. (2006). Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathologica*, 112(4), 389–404.
- Brownsey, R. W., Boone, A. N., Elliott, J. E., Kulpa, J. E., & Lee, W. M. (2006). Regulation of acetyl-



## BIBLIOGRAFÍA

- CoA carboxylase. *Biochemical Society Transactions*, 34(2), 223–227.
- Brugarolas, J., Lei, K., Hurley, R. L., Manning, B. D., Reiling, J. H., Hafen, E., Witters, L. A., Ellisen, L. W., & Kaelin, W. G. (2004). Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes and Development*, 18(23), 2893–2904.
- Bulbarelli, A., Lonati, E., Brambilla, A., Orlando, A., Cazzaniga, E., Piazza, F., Ferrarese, C., Masserini, M., & Sancini, G. (2012). Aβ42 production in brain capillary endothelial cells after oxygen and glucose deprivation. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 49(4), 415–422.
- Butovsky, O., Jedrychowski, M. P., Moore, C. S., Cialic, R., Lanser, A. J., Gabriely, G., Koeglsperger, T., Dake, B., Wu, P. M., Doykan, C. E., Fanek, Z., Liu, L., Chen, Z., Rothstein, J. D., Ransohoff, R. M., Gygi, S. P., Antel, J. P., & Weiner, H. L. (2014). Identification of a unique TGF-β-dependent molecular and functional signature in microglia. *Nature Neuroscience*, 17(1), 131–143.
- Carvalho, C., Correia, S. C., Santos, R. X., Cardoso, S., Moreira, P. I., Clark, T. A., Zhu, X., Smith, M. A., & Perry, G. (2009). Role of mitochondrial-mediated signaling pathways in Alzheimer disease and hypoxia. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 41(5), 433–440.
- Cash, T. P., Pan, Y., & Simon, M. C. (2007). Reactive oxygen species and cellular oxygen sensing. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(9), 1219–1225.
- Chatzi, C., Schnell, E., & Westbrook, G. L. (2015). Localized hypoxia within the subgranular zone determines the early survival of newborn hippocampal granule cells. *ELife*, 4, 1–18.
- Cheng, S. C., Scicluna, B. P., Arts, R. J. W., Gresnigt, M. S., Lachmandas, E., Giamarellos-Bourboulis, E. J., Kox, M., Manjeri, G. R., Wagenaars, J. A. L., Cremer, O. L., Leentjens, J., Van Der Meer, A. J., Van De Veerdonk, F. L., Bonten, M. J., Schultz, M. J., Willems, P. H. G. M., Pickkers, P., Joosten, L. A. B., Van Der Poll, T., & Netea, M. G. (2016). Broad defects in the energy metabolism of leukocytes underlie immunoparalysis in sepsis. *Nature Immunology*, 17(4), 406–413.
- Chávez-Gutiérrez, L., Bammens, L., Benilova, I., Vandersteen, A., Benurwar, M., Borgers, M., Lismont, S., Zhou, L., Van Cleynenbreugel, S., Esselmann, H., Wiltfang, J., Serneels, L., Karran, E., Gijzen, H., Schymkowitz, J., Rousseau, F., Broersen, K., & De Strooper, B. (2012). The mechanism of γ-secretase dysfunction in familial Alzheimer disease. *EMBO Journal*, 31(10), 2261–2274.
- Chiu, I. M., Morimoto, E. T. A., Goodarzi, H., Liao, J. T., Keeffe, S. O., Phatnani, H. P., Muratet, M., Carroll, M. C., Levy, S., Tavazoie, S., Myers, R. M., & Maniatis, T. (2013). A neurodegeneration-specific gene expression signature and immune profile of acutely isolated microglia from an ALS mouse model. *Cell Reports*, 4(2), 385–401.
- Cho, K., & Choi, G. E. (2017). Microglia: Physiological functions revealed through morphological profiles. *Folia Biologica*, 63(3), 85–90.
- Chouraki, V., & Seshadri, S. (2014). Genetics of Alzheimer's disease. *Advances in Genetics*, 87, 245–294.
- Cockman, M. E., Lippl, K., Tian, Y. M., Pegg, H. B., Figg, W. D., Abboud, M. I., Heilig, R., Fischer, R., Myllyharju, J., Schofield, C. J., & Ratcliffe, P. J. (2019). Lack of activity of recombinant HIF prolyl hydroxylases (PHDs) on reported non-HIF substrates. *ELife*, 8, 1–27.
- Cohan, C. H., Neumann, J. T., Dave, K. R., Alekseyenko, A., Binkert, M., Stransky, K., Lin, H. W., Barnes,



## BIBLIOGRAFÍA

- C. A., Wright, C. B., & Perez-Pinzon, M. A. (2015). Effect of cardiac arrest on cognitive impairment and hippocampal plasticity in middle-aged rats. *PLoS ONE*, 10(5), 1–18.
- Colgan, S. P., & Taylor, C. T. (2010). Hypoxia: an alarm signal during intestinal inflammation. *Nature Review Gastroenterology & Hepatology*, 7(5), 281–287.
- Colonna, M., & Butovsky, O. (2017). Microglia function in the central nervous system during health and neurodegeneration. *Annual Review of Immunology*, 35(1), 441–468.
- Condello, C., Yuan, P., Schain, A., & Grutzendler, J. (2015). Microglia constitute a barrier that prevents neurotoxic protofibrillar Aβ42 hotspots around plaques. *Nature Communications*, 6, 6176.
- Coraci, I. S., Husemann, J., Berman, J. W., Hulette, C., Dufour, J. H., Campanella, G. K., Luster, A. D., Silverstein, S. C., & El Khoury, J. B. (2002). CD36, a class B scavenger receptor, is expressed on microglia in Alzheimer's disease brains and can mediate production of reactive oxygen species in response to β-amyloid fibrils. *American Journal of Pathology*, 160(1), 101–112.
- Correia, S. C., & Moreira, P. I. (2010). Hypoxia-inducible factor 1: A new hope to counteract neurodegeneration? *Journal of Neurochemistry*, 112(1), 1–12.
- Cramer, T., Yamanishi, Y., Clausen, B. E., Förster, I., Pawlinski, R., Mackman, N., Haase, V. H., Jaenisch, R., Corr, M., Nizet, V., Firestein, G. S., Gerber, H. P., Ferrara, N., & Johnson, R. S. (2003). HIF-1α is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell*, 112(5), 645–657.
- Cross, A., Barnes, T., Bucknall, R. C., Edwards, S. W., & Moots, R. J. (2006). Neutrophil apoptosis in rheumatoid arthritis is regulated by local oxygen tensions within joints. *Journal of Leukocyte Biology*, 80(3), 521–528.
- D'Andrea, M. R., Cole, G. M., & Ard, M. D. (2004). The microglial phagocytic role with specific plaque types in the Alzheimer disease brain. *Neurobiology of Aging*, 25(5), 675–683.
- D'Ignazio, L., Bandarra, D., & Rocha, S. (2016). NF-κB and HIF crosstalk in immune responses. *FEBS Journal*, 283(3), 413–424.
- Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J. V., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D. R., Dustin, M. L., & Gan, W. B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature Neuroscience*, 8(6), 752–758.
- Dayan, F., Roux, D., Brahimi-Horn, M. C., Pouyssegur, J., & Mazure, N. M. (2006). The oxygen sensor factor-inhibiting hypoxia-inducible factor-1 controls expression of distinct genes through the bifunctional transcriptional character of hypoxia-inducible factor-1α. *Cancer Research*, 66(7), 3688–3698.
- De Bock, K., De Smet, F., De Oliveira, R. L., Anthonis, K., & Carmeliet, P. (2009). Endothelial oxygen sensors regulate tumor vessel abnormalization by instructing pericyte endothelial cells. *Journal of Molecular Medicine*, 87(6), 561–569.
- Deczkowska, A., Keren-Shaul, H., Weiner, A., Colonna, M., Schwartz, M., & Amit, I. (2018). Disease-associated microglia: A universal immune sensor of neurodegeneration. *Cell*, 173(5), 1073–1081.
- Del Peso, L., Castellanos, M. C., Temes, E., Martín-Puig, S., Cuevas, Y., Olmos, G., & Landázuri, M. O.



## BIBLIOGRAFÍA

- (2003). The von Hippel Lindau/hypoxia-inducible factor (HIF) pathway regulates the transcription of the HIF-proline hydroxylase genes in response to low oxygen. *Journal of Biological Chemistry*, 278(49), 48690–48695.
- Di Marco, L. Y., Venneri, A., Farkas, E., Evans, P. C., Marzo, A., & Frangi, A. F. (2015). Vascular dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease - A review of endothelium-mediated mechanisms and ensuing vicious circles. *Neurobiology of Disease*, 82, 593–606.
- Diskin, C., & Pålsson-McDermott, E. M. (2018). Metabolic modulation in macrophage effector function. *Frontiers in Immunology*, 9, 1–17.
- Dodd, K. M., Yang, J., Shen, M. H., Sampson, J. R., & Tee, A. R. (2015). mTORC1 drives HIF-1 $\alpha$  and VEGF-A signalling via multiple mechanisms involving 4E-BP1, S6K1 and STAT3. *Oncogene*, 34(17), 2239–2250.
- Domingues, C., da Cruz e Silva, O. A. B., & Henriques, A. G. (2017). Impact of cytokines and chemokines on Alzheimer's disease neuropathological hallmarks. *Current Alzheimer Research*, 14(8), 870–882.
- Edgar, R. (2002). Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Research*, 30(1), 207–210.
- El Khoury, J. B., Moore, K. J., Means, T. K., Leung, J., Terada, K., Toft, M., Freeman, M. W., & Luster, A. D. (2003). CD36 mediates the innate host response to  $\beta$ -amyloid. *Journal of Experimental Medicine*, 197(12), 1657–1666.
- El Khoury, J., Toft, M., Hickman, S. E., Means, T. K., Terada, K., Geula, C., & Luster, A. D. (2007). Ccr2 deficiency impairs microglial accumulation and accelerates progression of Alzheimer-like disease. *Nature Medicine*, 13(4), 432–438.
- Eltzschig, H. K., & Carmeliet, P. (2011). Hypoxia and inflammation. *The New England Journal of Medicine*, 364(7), 656–665.
- ENCODE Project Consortium (2012). An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*, 489(7414), 57–74.
- Escobese, M. M., Sierra-Filardi, E., Nieto, C., Samaniego, R., Sánchez-Torres, C., Matsuyama, T., Calderon-Gómez, E., Vega, M. A., Salas, A., Sánchez-Mateos, P., & Corbí, A. L. (2012). The prolyl hydroxylase PHD3 identifies proinflammatory macrophages and its expression is regulated by activin A. *The Journal of Immunology*, 189(4), 1946–1954.
- Fajersztajn, L., & Veras, M. M. (2017). Hypoxia: From placental development to fetal programming. *Birth Defects Research*, 109(17), 1377–1385.
- Fang, H. Y., Hughes, R., Murdoch, C., Coffelt, S. B., Biswas, S. K., Harris, A. L., Johnson, R. S., Imityaz, H. Z., Simon, M. C., Fredlund, E., Greten, F. R., Rius, J., & Lewis, C. E. (2009). Hypoxia-inducible factors 1 and 2 are important transcriptional effectors in primary macrophages experiencing hypoxia. *Blood*, 114(4), 844–859.
- Fang, H., Zhang, L. F., Meng, F. T., Du, X., & Zhou, J. N. (2010). Acute hypoxia promote the phosphorylation of tau via ERK pathway. *Neuroscience Letters*, 474(3), 173–177.
- Farkas, E., & Luiten, P. G. M. (2001). Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's





## BIBLIOGRAFÍA

- disease. *Progress in Neurobiology*, 64(6), 575-611.
- Fernández-Checa, J. C., Fernández, A., Morales, A., Marí, M., García-Ruiz, C., & Colell, A. (2010). Oxidative stress and altered mitochondrial function in neurodegenerative diseases: Lessons from mouse models. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 9, 439-454.
- Fisk, L., Nalivaeva, N. N., Boyle, J. P., Peers, C. S., & Turner, A. J. (2007). Effects of hypoxia and oxidative stress on expression of neprilysin in human neuroblastoma cells and rat cortical neurones and astrocytes. *Neurochemical Research*, 32(10), 1741-1748.
- Fourgeaud, L., Través, P. G., Tufail, Y., Leal-Bailey, H., Dew, E. D., Burrola, P. G., Callaway, P., Zagórska, A., Rothlin, C. V., Nimmerjahn, A., & Lemke, G. (2016). TAM receptors regulate multiple features of microglial physiology. *Nature*, 532(7598), 240-244.
- Frautschy, S. A., Yang, F., Irrizarry, M., Hyman, B., Saido, T. C., Hsiao, K., & Cole, G. M. (1998). Microglial response to amyloid plaques in APPsw transgenic mice. *American Journal of Pathology*, 152(1), 307-317.
- Frede, S., Stockmann, C., Freitag, P., & Fandrey, J. (2006). Bacterial lipopolysaccharide induces HIF-1 activation in human monocytes via p44/42 MAPK and NF-κB. *Biochemical Journal*, 396(3), 517-527.
- Friedman, B. A., Srinivasan, K., Ayalon, G., Meilandt, W. J., Lin, H., Huntley, M. a., Cao, Y., Lee, S. H., Haddick, P. C. G., Ngu, H., Modrusan, Z., Larson, J. L., Kaminker, J. S., van der Brug, M. P., & Hansen, D. V. (2018). Diverse brain myeloid expression profiles reveal distinct microglial activation states and aspects of Alzheimer's disease not evident in mouse models. *Cell Reports*, 22(3), 832-847.
- Fuhrmann, M., Bittner, T., Jung, C. K. E., Burgold, S., Page, R. M., Mitteregger, G., Haass, C., LaFerla, F. M., Kretschmar, H., & Herms, J. (2010). Microglial Cx3cr1 knockout prevents neuron loss in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature Neuroscience*, 13(4), 41.
- Gautier, E. L., Shay, T., Miller, J., Greter, M., Jakubzick, C., Ivanon, S., Helft, J., Chow, A., Elpek, K. G., Gordonov, S., Mazloom, A. R., Ma'ayan, A., Chua, W. J., Hansen, T. H., Turley, S. J., Merad, M., & Randolph, G. J. (2012). Gene expression profiles and transcriptional regulatory pathways underlying mouse tissue macrophage identity and diversity. *Nature Immunology*, 13(11), 1118-1128.
- German, N. J., Yoon, H., Yusuf, R. Z., Murphy, J. P., Finley, L. W. S., Laurent, G., Haas, W., Satterstrom, F. K., Guarnerio, J., Zaganjor, E., Santos, D., Pandolfi, P. P., Beck, A. H., Gygi, S. P., Scadden, D. T., Kaelin, W. G., & Haigis, M. C. (2016). PHD3 loss in cancer enables metabolic reliance on fatty acid oxidation via deactivation of ACC2. *Molecular Cell*, 63(6), 1006-1020.
- Giatromanolaki, A., Sivridis, E., Maltezos, E., Papazoglou, D., Simopoulos, C., Gatter, K. C., Harris, A. L., & Koukourakis, M. I. (2003). Hypoxia inducible factor 1α and 2α overexpression in inflammatory bowel disease. *Journal of Clinical Pathology*, 56(3), 209-213.
- Ginhoux, F., Lim, S., Hoeffel, G., Low, D., & Huber, T. (2013). Origin and differentiation of microglia. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7, 1-14.
- Ginhoux, F., & Prinz, M. (2015). Origin of microglia: Current concepts and past controversies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(8), 1-15.



## BIBLIOGRAFÍA

- Ginouvé, A., Ilc, K., Macias, N., Pouyssegur, J., & Berra, E. (2008). PHDs overactivation during chronic hypoxia "desensitizes" HIF and protects cells from necrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(12), 4745–4750.
- Girardin, S. E., Boneca, I. G., Viala, J., Chamaillard, M., Labigne, A., Thomas, G., Philpott, D. J., & Sansonetti, P. J. (2003). Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *Journal of Biological Chemistry*, 278(11), 8869–8872.
- Gold, M., & El Khoury, J. (2015).  $\beta$ -amyloid, microglia, and the inflammasome in Alzheimer's disease. *Seminars in Immunopathology*, 37(6), 607–611.
- Gomes, L. C., Benedetto, G. Di, & Scorrano, L. (2011). During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nature Cell Biology*, 13(5), 589–598.
- Grieciuc, A., Serrano-Pozo, A., Parrado, A. R., Lesinski, A. N., Asselin, C. N., Mullin, K., Hooli, B., Choi, S. H., Hyman, B. T., & Tanzi, R. E. (2013). Alzheimer's disease risk gene CD33 inhibits microglial uptake of amyloid beta. *Neuron*, 78(4), 631–643.
- Haase, V. H., Glickman, J. N., Socolovsky, M., & Jaenisch, R. (2001). Vascular tumors in livers with targeted inactivation of the von Hippel-Lindau tumor suppressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(4), 1583–1588.
- Hachinski, V. (2015). Stroke and potentially preventable dementias proclamation: Updated world stroke day proclamation. *Stroke*, 46(11), 3039–3040.
- Hagen, T., Taylor, C. T., Lam, F., & Moncada, S. (2003). Redistribution of intracellular oxygen in hypoxia by nitric oxide: Effect on HIF1 $\alpha$ . *Science*, 302(5652), 1975–1978.
- Hagmann, C. A., Herzner, A. M., Abdullah, Z., Zillinger, T., Jakobs, C., Schuberth, C., Coch, C., Higgins, P. G., Wisplinghoff, H., Barchet, W., Hornung, V., Hartmann, G., & Schlee, M. (2013). RIG-I detects triphosphorylated RNA of listeria monocytogenes during infection in non-immune cells. *PLoS ONE*, 8(4), 1–11.
- Hardy, J. A., & Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's disease: The amyloid cascade hypothesis. *Science*, 256, 184–185.
- Hardy, J., & Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297(5580), 353–357.
- Harold, D., Abraham, R., Hollingworth, P., Sims, R., Hamshere, M., Pahwa, J. S., Moskvina, V., Williams, A., Jones, N., Thomas, C., Stretton, A., Lovestone, S., Powell, J., Proitsi, P., Lupton, M. K., Rubinsztein, D. C., Gill, M., Lawlor, B., Lynch, A., ... Pankratz, V. S. (2009). Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease, and shows evidence for additional susceptibility genes. *Nature Genetics*, 41(10), 1088–1093.
- Harris, A. J., Thompson, A. A. R., Whyte, M. K. B., & Walmsley, S. R. (2014). HIF-mediated innate immune responses: Cell signaling and therapeutic implications. *Hypoxia*, 2, 47–58.
- Haynes, S. E., Hollopeter, G., Yang, G., Kurpius, D., Dailey, M. E., Gan, W. B., & Julius, D. (2006). The P2Y<sub>12</sub> receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nature Neuroscience*, 9(12), 1512–1519.
- Hays, C. C., Zlatar, Z. Z., & Wierenga, C. E. (2016). The utility of cerebral blood flow as a biomarker



## BIBLIOGRAFÍA

- of preclinical Alzheimer's disease. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 36(2), 167–179.
- Healy, L. M., Perron, G., Won, S.-Y., Michell-Robinson, M. A., Rezk, A., Ludwin, S. K., Moore, C. S., Hall, J. A., Bar-Or, A., & Antel, J. P. (2016). MerTK is a functional regulator of myelin phagocytosis by human myeloid cells. *The Journal of Immunology*, 196(8), 3375–3384.
- Heneka, M. T., Carson, M. J., El Khoury, J., Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., Jacobs, A. H., Wyss-coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R. M., Herrup, K., Frautschy, S. A., Finsen, B., Brown, G. C., Verkhratsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., ... Kummer, M. P. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurology*, 14(4), 388–405.
- Heras-Garvín, A. (2015). Microglía e hipoxia: Implicaciones en la enfermedad de Alzheimer. *Tesis doctoral, Universidad de Sevilla*.
- Hervás-Stubbs, S., Pérez-Gracia, J. L., Rouzaut, A., Sanmamed, M. F., Le Bon, A., & Melero, I. (2011). Direct effects of type I interferons on cells of the immune system. *Clinical Cancer Research*, 17(9), 2619–2627.
- Herzenberg, L. A., Tung, J., Moore, W. A., Herzenberg, L. A., & Parks, D. R. (2006). Interpreting flow cytometry data: A guide for the perplexed. *Nature Immunology*, 7(7), 681–685.
- Hickman, S. E., Allison, E. K., & El Khoury, J. (2008). Microglial dysfunction and defective  $\beta$ -amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice. *Journal of Neuroscience*, 28(33), 8354–8360.
- Hickman, S. E., Izzy, S., Sen, P., Morsett, L., & El Khoury, J. (2018). Microglia in neurodegeneration. *Nature Neuroscience*, 21(10), 1359–1369.
- Hickman, S. E., Kingery, N. D., Ohsumi, T., Borowsky, M., Wang, L., Means, T. K., & El Khoury, J. (2013). The microglial sensome revealed by direct RNA sequencing. *Nature Neuroscience*, 16(12), 1896–1905.
- Hollingworth, P., Harold, D., Sims, R., Gerrish, A., Lambert, C., Carrasquillo, M. M., Abraham, R., Marian, L., Pahwa, J. S., Moskvin, V., Dowzell, K., Stretton, A., Thomas, C., Richards, A., Ivanov, D., Chapman, J., Lovestone, S., Powell, J., Proitsi, P., ... Brice, A. (2011). Common variants in ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. *Nature Genetics*, 43(5), 429–435.
- Holtman, I. R., Raj, D. D., Miller, J. A., Schaafsma, W., Yin, Z., Brouwer, N., Wes, P. D., Möller, T., Orre, M., Kamphuis, W., Hol, E. M., Boddeke, E. W. G. M., & Eggen, B. J. L. (2015). Induction of a common microglia gene expression signature by aging and neurodegenerative conditions: a co-expression meta-analysis. *Acta Neuropathologica Communications*, 3, 31.
- Holtzman, D. M., Herz, J., & Bu, G. (2012). Apolipoprotein E and apolipoprotein E receptors: Normal biology and roles in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspective in Medicine*, 2(3), 1–24.
- Honda, K., Yanai, H., Negishi, H., Asagiri, M., Sato, M., Mizutani, T., Shimada, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yoshida, N., & Taniguchi, T. (2005). IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature*, 434(7034), 772–777.
- Hong, S., Beja-Glasser, V. F., Nfonoyim, B. M., Frounin, A., Li, S., Ramakrishnan, S., Merry, K. M., Shi, Q., Rosenthal, A., Barres, B. A., Lemere, C. A., Selkoe, D. J., & Stevens, B. (2016). Complement



## BIBLIOGRAFÍA

- and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse model. *Science*, 352(6286), 12–16.
- Hunting, P. (2015). Alois Alzheimer (1864–1915). *Journal of Medical Biography*, 23(4), 238–239.
- Iadecola, C. (2004). Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(5), 347–360.
- Iadecola, C. (2013). The pathobiology of vascular dementia. *Neuron*, 80(4), 844–866.
- Imai, S., & Guarente, L. (2014). NAD<sup>+</sup> and sirtuins in aging and disease. *Trends in Cell Biology*, 24(8), 464–471.
- Imtiyaz, H. Z., & Simon, M. C. (2010). Hypoxia-inducible factors as essential regulators of inflammation. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 345, 105–120.
- Ingelsson, M., Fukumoto, H., Newell, K. L., Growdon, J. H., Hedley-Whyte, E. T., Frosch, M. P., Albert, M. S., Hyman, B. T., & Irizarry, M. C. (2004). Early A $\beta$  accumulation and progressive synaptic loss, gliosis, and tangle formation in AD brain. *Neurology*, 62(6), 925–931.
- Inohara, N., Ogura, Y., Fontalba, A., Gutierrez, O., Pons, F., Crespo, J., Fukase, K., Inamura, S., Kusumoto, S., Hashimoto, M., Foster, S. J., Moran, A. P., Fernandez-Luna, J. L., & Nuñez, G. (2003). Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2: Implications for Crohn's disease. *Journal of Biological Chemistry*, 278(8), 5509–5512.
- Iturria-Medina, Y., Sotero, R. C., Toussaint, P. J., Mateos-Pérez, J. M., Evans, A. C., Weiner, M. W., Aisen, P., Petersen, R., Jack, C. R., Jagust, W., Trojanowki, J. Q., Toga, A. W., Beckett, L., Green, R. C., Saykin, A. J., Morris, J., Shaw, L. M., Khachaturian, Z., Sorensen, G., ... Furst, A. J. (2016). Early role of vascular dysregulation on late-onset Alzheimer's disease based on multifactorial data-driven analysis. *Nature Communications*, 7, 11934.
- Jaakkola, P., Mole, D. R., Tian, Y. M., Wilson, M. I., Gielbert, J., Gaskell, S. J., von Kriegsheim, A., Hebestreit, H. F., Mukherji, M., Schofield, C. J., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., & Ratcliffe, P. J. (2001). Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science*, 292 (5516), 468–472.
- Jankowsky, J. L., Fadale, D. J., Anderson, J., Xu, G. M., Gonzales, V., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Lee, M. K., Younkin, L. H., Wagner, S. L., Younkin, S. G., & Borchelt, D. R. (2004). Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue  $\beta$ -amyloid peptide in vivo: Evidence for augmentation of a 42-specific  $\gamma$  secretase. *Human Molecular Genetics*, 13(2), 159–170.
- Jeynes, B., & Provias, J. (2006). The possible role of capillary cerebral amyloid angiopathy in Alzheimer lesion development: A regional comparison. *Acta Neuropathologica*, 112(4), 417–427.
- Jonsson, T., Stefansson, H., Steinberg, S., Jonsdottir, I., Jonsson, P. V., Snaedal, J., Bjornsson, S., Huttenlocher, J., Levey, A. I., Lah, J. J., Rujescu, D., Hampel, H., Giegling, I., Andreassen, O. A., Engedal, K., Ulstein, I., Djurovic, S., Ibrahim-Verbaas, C., Hofman, A., ... Stefansson, K. (2013). Variant of TREM2 associated with the risk of AD. *New England Journal of Medicine*, 368(2), 107–116.
- Jung, Y., Isaacs, J. S., Lee, S., Trepel, J., Liu, Z., & Neckers, L. (2003a). Hypoxia-inducible factor induction by tumor necrosis factor in normoxic cells requires receptor-interacting protein-



## BIBLIOGRAFÍA

- dependent nuclear factor  $\kappa$ B activation. *Biochemical Journal*, 370, 1011-1017.
- Jung, Y., Isaacs, J. S., Lee, S., Trepel, J., Liu, Z., & Neckers, L. (2003b). IL-1 $\beta$  mediated up-regulation of HIF-1 $\alpha$  via an NF $\kappa$ B/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis. *The FASEB Journal*, 17(14), 1-22.
- Kaelin, W. G. (2005). Proline hydroxylation and gene expression. *Annual Review of Biochemistry*, 74(1), 115-128.
- Kaelin, W. G., & Ratcliffe, P. J. (2008). Oxygen sensing by metazoans: The central role of the HIF hydroxylase pathway. *Molecular Cell*, 30(4), 393-402.
- Kalaria, R. N. (1997). Cerebrovascular degeneration is related to amyloid-beta protein deposition in Alzheimer's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 826, 263-271.
- Kalaria, R. N. (2010). Vascular basis for brain degeneration: Faltering controls and risk factors for dementia. *Nutrition Reviews*, 68(2), 74-87.
- Kamphuis, W., Orre, M., Kooijman, L., Dahmen, M., & Hol, E. M. (2012). Differential cell proliferation in the cortex of the APPswePS1dE9 Alzheimer's disease mouse model. *Glia*, 60(4), 615-629.
- Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K. J., Yamaguchi, O., Otsu, K., Tsujimura, T., Koh, C. S., Reis E Sousa, C., Matsuura, Y., Fujita, T., & Akira, S. (2006). Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*, 441(1), 101-105.
- Kauffmann, A., Gentleman, R., & Huber, W. (2009). ArrayQualityMetrics - A bioconductor package for quality assessment of microarray data. *Bioinformatics*, 25(3), 415-416.
- Kawai, M., Kalaria, R. N., Harik, S. I., & Perry, G. (1990). The relationship of amyloid plaques to cerebral capillaries in Alzheimer's disease. *American Journal of Pathology*, 137(6), 1435-1446.
- Kawai, Mitsuru, Cras, P., & Perry, G. (1992). Serial reconstruction of  $\beta$ -protein amyloid plaques: Relationship to microvessels and size distribution. *Brain Research*, 592(1-2), 278-282.
- Keren-Shaul, H., Spinrad, A., Weiner, A., Matcovitch-Natan, O., Dvir-Szternfeld, R., Ulland, T. K., David, E., Baruch, K., Lara-Astaiso, D., Toth, B., Itzkovitz, S., Colonna, M., Schwartz, M., & Amit, I. (2017). A unique microglia type associated with restricting development of Alzheimer's disease. *Cell*, 169(7), 1276-1290.
- Kerridge, C., Kozlova, D. I., Nalivaeva, N. N., & Turner, A. J. (2015). Hypoxia affects neprilysin expression through caspase activation and an APP intracellular domain-dependent mechanism. *Frontiers in Neuroscience*, 9, 1-9.
- Kettenmann, H., Hanisch, U. K., Noda, M., & Verkhratsky, A. (2011). Physiology of microglia. *Physiological Reviews*, 91(2), 461-553.
- Kierdorf, K., Erny, D., Goldmann, T., Sander, V., Schulz, C., Perdiguero, E. G., Wieghofer, P., Heinrich, A., Riemke, P., Hölscher, C., Müller, D. N., Luckow, B., Brouwer, T., Debus, K., Fritz, G., Opdenakker, G., Diefenbach, A., Biber, K., Heikenwalder, M., ... Prinz, M. (2013). Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1-and Irf8-dependent pathways. *Nature Neuroscience*, 16(3), 273-280.





## BIBLIOGRAFÍA

- Kierdorf, K., & Prinz, M. (2013). Factors regulating microglia activation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7, 1–8.
- Kikuchi, D., Minamishima, Y. A., & Nakayama, K. (2014). Prolyl-hydroxylase PHD3 interacts with pyruvate dehydrogenase (PDH)-E1 $\beta$  and regulates the cellular PDH activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 451(2), 288–294.
- Kim, J. W., Tchernyshyov, I., Semenza, G. L., & Dang, C. V. (2006). HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metabolism*, 3(3), 177–185.
- Kim, K. S., Rajagopal, V., Gonsalves, C., Johnson, C., & Kalra, V. K. (2006). A novel role of hypoxia-inducible factor in cobalt chloride- and hypoxia-mediated expression of IL-8 chemokine in human endothelial cells. *The Journal of Immunology*, 177(10), 7211–7224.
- Kiryk, A., Pluta, R., Figiel, I., Mikosz, M., Ułamek, M., Niewiadomska, G., Jablonski, M., & Kaczmarek, L. (2011). Transient brain ischemia due to cardiac arrest causes irreversible long-lasting cognitive injury. *Behavioural Brain Research*, 219(1), 1–7.
- Kiss, J., Mollenhauer, M., Walmsley, S. R., Kirchberg, J., Radhakrishnan, P., Niemietz, T., Dudda, J., Steinert, G., Whyte, M. K. B., Carmeliet, P., Mazzone, M., Weitz, J., & Schneider, M. (2012). Loss of the oxygen sensor PHD3 enhances the innate immune response to abdominal sepsis. *The Journal of Immunology*, 189(4), 1955–1965.
- Knopman, D. S., & Roberts, R. (2010). Vascular risk factors: Imaging and neuropathologic correlates. *Journal of Alzheimer's Disease*, 20(3), 699–709.
- Knowles, H. J., Mole, D. R., Ratcliffe, P. J., & Harris, A. L. (2006). Normoxic stabilization of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  by modulation of the labile iron pool in differentiating U937 macrophages: Effect of natural resistance-associated macrophage protein 1. *Cancer Research*, 66(5), 2600–2607.
- Koivunen, P., Hirsilä, M., Günzler, V., Kivirikko, K. I., & Myllyharju, J. (2004). Catalytic properties of the asparaginyl hydroxylase (FIH) in the oxygen sensing pathway are distinct from those of its prolyl 4-hydroxylases. *Journal of Biological Chemistry*, 279(11), 9899–9904.
- Kondo, K., & Kaelin, W. G. (2001). The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. *Experimental Cell Research*, 264(1), 117–125.
- Kouznetsova, E., Klingner, M., Sorger, D., Sabri, O., Großmann, U., Steinbach, J., Scheunemann, M., & Schliebs, R. (2006). Developmental and amyloid plaque-related changes in cerebral cortical capillaries in transgenic Tg2576 Alzheimer mice. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 24(2–3), 187–193.
- Krasemann, S., Madore, C., Cialic, R., Baufeld, C., Calcagno, N., El Fatimy, R., Beckers, L., O'Loughlin, E., Xu, Y., Fanek, Z., Greco, D. J., Smith, S. T., Tweet, G., Humulock, Z., Zrzavy, T., Conde-Sanroman, P., Gacias, M., Weng, Z., Chen, H., ... Butovsky, O. (2017). The TREM2-APOE pathway drives the transcriptional phenotype of dysfunctional microglia in neurodegenerative diseases. *Immunity*, 47(3), 566–581.
- Kroczyńska, B., Rafidi, R. L., Majchrzak-Kita, B., Kosciuzuk, E. M., Blyth, G. T., Jemielity, J., Warminska, Z., Saleiro, D., Mehrotra, S., Arslan, A. D., Fish, E. N., & Platanias, L. C. (2016).



## BIBLIOGRAFÍA

- Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) signaling via mechanistic target of rapamycin complex 2 (mTORC2) and regulatory effects in the generation of type II interferon biological responses. *Journal of Biological Chemistry*, 291(5), 2389–2396.
- Krüger, B., Krick, S., Dhillon, N., Lerner, S. M., Ames, S., Bromberg, J. S., Lin, M., Walsh, L., Vella, J., Fischeder, M., Krämer, B. K., Colvin, R. B., Heeger, P. S., Murphy, B. T., & Schröppel, B. (2009). Donor toll-like receptor 4 contributes to ischemia and reperfusion injury following human kidney transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(9), 3390–3395.
- Kumar-Shing, S., Theuns, J., Van Broeck, B., Pirici, D., Vennekens, K., Corsmit, E., Cruts, M., Dermaut, B., Wang, R., & Van Broeckhoven, C. (2006). Mean age-of-onset of familial Alzheimer disease caused by presenilin mutation correlates with both increased A $\beta$ 42 and decreased A $\beta$ 40. *Human Mutation*, 27(7), 686–695.
- Kumar, D. K. V., Choi, H. S., Washicosky, K. J., Eimer, W. A., Tucker, S., Ghofrani, J., Lefkowitz, A., McColl, G., Goldstein, L. E., Tanzi, R. E., & Moir, R. D. (2016). Amyloid- $\beta$  peptide protects against microbial infection in mouse and worm models of Alzheimer's disease. *Science Translational Medicine*, 8(340), 840ra72.
- Kumar, H., Kawai, T., & Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *International Reviews of Immunology*, 30(1), 16–34.
- Lall, R., Mohammed, R., & Ojha, U. (2019). What are the links between hypoxia and Alzheimer's disease? *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 15, 1343–1354.
- Lambert, J. C., Heath, S., Even, G., Campion, D., Sleegers, K., Hiltunen, M., Combarros, O., Zelenika, D., Bullido, M. J., Tavernier, B., Letenneur, L., Bettens, K., Berr, C., Pasquier, F., Fiévet, N., Barberger-Gateau, P., Engelborghs, S., De Deyn, P., Mateo, I., ... Pilotto, A. (2009). Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nature Genetics*, 41(10), 1094–1099.
- Lambert, J. C., Ibrahim-Verbaas, C. A., Harold, D., Naj, A. C., Sims, R., Bellenguez, C., Jun, G., DeStefano, A. L., Bis, J. C., Beecham, G. W., Grenier-Boley, B., Russo, G., Thornton-Wells, T. A., Jones, N., Smith, A. V., Chouraki, V., Thomas, C., Ikram, M. A., Zelenika, D., ... Seshadri, S. (2013). Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nature Genetics*, 45(12), 1452–1458.
- Land, S. C., & Tee, A. R. (2007). Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  is regulated by the mammalian target of rapamycin (mTOR) via an mTOR signaling motif. *Journal of Biological Chemistry*, 282(28), 20534–20543.
- Lando, D., Peet, D. J., Gorman, J. J., Whelan, D. A., Whitelaw, M. L., & Bruick, R. K. (2002). FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes and Development*, 16, 1466–1471.
- Lane, C. A., Hardy, J., & Schott, J. M. (2018). Alzheimer's disease. *European Journal of Neurology*, 25(1), 59–70.
- Lawson, L. J., Perry, V. H., Dri, P., & Gordon, S. (1990). Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*, 39(1), 151–170.





## BIBLIOGRAFÍA

- Lee, G. D., Aruna, J. H., Barrett, P. M., Lei, D. L., Ingram, D. K., & Mouton, P. R. (2005). Stereological analysis of microvascular parameters in a double transgenic model of Alzheimer's disease. *Brain Research Bulletin*, 65(4), 317–322.
- Lee, S., Nakamura, E., Yang, H., Wei, W., Linggi, M. S., Sajan, M. P., Farese, R. V., Freeman, R. S., Carter, B. D., Kaelin, W. G., & Schlisio, S. (2005). Neuronal apoptosis linked to EglN3 prolyl hydroxylase and familial pheochromocytoma genes: Developmental culling and cancer. *Cancer Cell*, 8(2), 155–167.
- Lewis, J. S., Lee, J. A., Underwood, J. C. E., Harris, A. L., & Lewis, C. E. (1999). Macrophage responses to hypoxia: Relevance to disease mechanisms. *Journal of Leukocyte Biology*, 66(6), 889–900.
- Leyns, C. E. G., Gratuze, M., Narasimhan, S., Jain, N., Koscal, L. J., Jiang, H., Manis, M., Colonna, M., Lee, V. M. Y., Ulrich, J. D., & Holtzman, D. M. (2019). TREM2 function impedes tau seeding in neuritic plaques. *Nature Neuroscience*, 22(8), 1217–1222.
- Li, J., Huang, Q., Long, X., Guo, X., Sun, X., Jin, X., Li, Z., Ren, T., Yuan, P., Huang, X., Zhang, H., & Xing, J. (2017). Mitochondrial elongation-mediated glucose metabolism reprogramming is essential for tumour cell survival during energy stress. *Oncogene*, 36(34), 4901–4912.
- Li, J., Wang, Y. J., Zhang, M., Fang, C. Q., & Zhou, H. D. (2011). Cerebral ischemia aggravates cognitive impairment in a rat model of Alzheimer's disease. *Life Sciences*, 89(3–4), 86–92.
- Li, L., Zhang, X., Yang, D., Luo, G., Chen, S., & Le, W. (2009). Hypoxia increases A $\beta$  generation by altering  $\beta$ - and  $\gamma$ -cleavage of APP. *Neurobiology of Aging*, 30(7), 1091–1098.
- Li, Y., Wang, Y., Kim, E., Beemiller, P., Wang, C. Y., Swanson, J., You, M., & Guan, K. L. (2007). Bnip3 mediates the hypoxia-induced inhibition on mammalian target of rapamycin by interacting with Rheb. *Journal of Biological Chemistry*, 282(49), 35803–35813.
- Liddel, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., Bennett, M. L., Münch, A. E., Chung, W. S., Peterson, T. C., Wilton, D. K., Frouin, A., Napier, B. A., Panicker, N., Kumar, M., Buckwalter, M. S., Rowitch, D. H., Dawson, V. L., Dawson, T. M., ... Barres, B. A. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, 541(7638), 481–487.
- Lim, J. H., Lee, Y. M., Chun, Y. S., Chen, J., Kim, J. E., & Park, J. W. (2010). Sirtuin 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Molecular Cell*, 38(6), 864–878.
- Lin, F. C., & Young, H. A. (2014). Interferons: Success in anti-viral immunotherapy. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 25(4), 369–376.
- Litvak, V., Ratushny, A. V., Lampano, A. E., Schmitz, F., Huang, A. C., Raman, A., Rust, A. G., Bergthaler, A., Aitchison, J. D., & Aderem, A. (2012). A FOXO3–IRF7 gene regulatory circuit limits inflammatory sequelae of antiviral responses. *Nature*, 490(7420), 421–425.
- Liu, H., Qiu, H., Yang, J., Ni, J., & Le, W. (2016). Chronic hypoxia facilitates Alzheimer's disease through demethylation of  $\gamma$ -secretase by downregulating DNA methyltransferase 3b. *Alzheimer's and Dementia*, 12(2), 130–143.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402–408.



## BIBLIOGRAFÍA

- Livingston, G., Sommerlad, A., Orgeta, V., Costafreda, S. G., Huntley, J., Ames, D., Ballard, C., Banerjee, S., Burns, A., Cohen-Mansfield, J., Cooper, C., Fox, N., Gitlin, L. N., Howard, R., Kales, H. C., Larson, E. B., Ritchie, K., Rockwood, K., Sampson, E. L., ... Mukadam, N. (2017). Dementia prevention, intervention, and care. *Lancet*, 390(10113), 2673–2734.
- Love, S., & Miners, J. S. (2016a). Cerebral hypoperfusion and the energy deficit in Alzheimer's disease. *Brain Pathology*, 26(5), 607–617.
- Love, S., & Miners, J. S. (2016b). Cerebrovascular disease in ageing and Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 131(5), 645–658.
- Loy, C. T., Schofield, P. R., Turner, A. M., & Kwok, J. B. J. (2014). Genetics of dementia. *Lancet*, 383(9919), 828–840.
- Lucin, K. M., & Wyss-Coray, T. (2009). Immune activation in brain aging and neurodegeneration: too much or too little? *Neuron*, 64(1), 110–122.
- Lui, H., Zhang, J., Makinson, S. R., Cahill, M. K., Kelley, K. W., Huang, H. Y., Shang, Y., Oldham, M. C., Martens, L. H., Gao, F., Coppola, G., Sloan, S. A., Hsieh, C. L., Kim, C. C., Bigio, E. H., Weintraub, S., Mesulam, M. M., Rademakers, R., MacKenzie, I. R., ... Huang, E. J. (2016). Progranulin deficiency promotes circuit-specific synaptic pruning by microglia via complement activation. *Cell*, 165(4), 921–935.
- Majmundar, A. J., Wong, W. J., & Simon, M. C. (2010). Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Molecular Cell*, 40(2), 294–309.
- Martin, E., Boucher, C., Fontaine, B., & Delarasse, C. (2017). Distinct inflammatory phenotypes of microglia and monocyte-derived macrophages in Alzheimer's disease models: effects of aging and amyloid pathology. *Aging Cell*, 16(1), 27–38.
- Masson, N., Appelhoff, R. J., Tuckerman, J. R., Tian, Y. M., Demol, H., Puype, M., Vandekerckhove, J., Ratcliffe, P. J., & Pugh, C. W. (2004). The HIF prolyl hydroxylase PHD3 is a potential substrate of the TRiC chaperonin. *FEBS Letters*, 570(1–3), 166–170.
- Mazumdar, J., O'Brien, W. T., Johnson, R. S., Lamanna, J. C., Chavez, J. C., Klein, P. S., & Simon, M. C. (2010). O<sub>2</sub> regulates stem cells through Wnt/ $\beta$ -catenin signalling. *Nature Cell Biology*, 12(10), 1007–1013.
- McGovern, N. N., Cowburn, A. S., Porter, L., Walmsley, S. R., Summers, C., Thompson, A. A. R., Anwar, S., Willcocks, L. C., Whyte, M. K. B., Condliffe, A. M., & Chilvers, E. R. (2011). Hypoxia selectively inhibits respiratory burst activity and killing of staphylococcus aureus in human neutrophils. *The Journal of Immunology*, 186(1), 453–463.
- Metzen, E., Berchner-Pfannschmidt, U., Stengel, P., Marxsen, J. H., Stolze, I., Klinger, M., Huang, W. Q., Wotzlaw, C., Hellwig-Bürgel, T., Jelkmann, W., Acker, H., & Fandrey, J. (2003). Intracellular localisation of human HIF-1 $\alpha$  hydroxylases: Implications for oxygen sensing. *Journal of Cell Science*, 116(7), 1319–1326.
- Meyer, E. P., Ulmann-Schuler, A., Staufenbiel, M., & Krucker, T. (2008). Altered morphology and 3D architecture of brain vasculature in a mouse model for Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(9), 3587–3592.
- Miikkulainen, P., Högel, H., Rantanen, K., Suomi, T., Kouvonen, P., Elo, L. L., & Jaakkola, P. M. (2017).



## BIBLIOGRAFÍA

- HIF prolyl hydroxylase PHD3 regulates translational machinery and glucose metabolism in clear cell renal cell carcinoma. *Cancer & Metabolism*, 5(1), 1–17.
- Minter, M. R., Moore, Z., Zhang, M., Brody, K. M., Jones, N. C., Shultz, S. R., Taylor, J. M., & Crack, P. J. (2016). Deletion of the type-1 interferon receptor in APPSWE/PS1ΔE9 mice preserves cognitive function and alters glial phenotype. *Acta Neuropathologica Communications*, 4(1), 72.
- Molina, A. J. A., Wikstrom, J. D., Stiles, L., Las, G., Mohamed, H., Elorza, A., Walzer, G., Twig, G., Katz, S., Corkey, B. E., & Shirihai, O. S. (2009). Mitochondrial networking protects β-cells from nutrient-induced apoptosis. *Diabetes*, 58(10), 2303–2315.
- Montagne, A., Barnes, S. R., Sweeney, M. D., Halliday, M. R., Sagare, A. P., Zhao, Z., Toga, A. W., Jacobs, R. E., Liu, C. Y., Amezcua, L., Harrington, M. G., Chui, H. C., Law, M., & Zlokovic, B. V. (2015). Blood-brain barrier breakdown in the aging human hippocampus. *Neuron*, 85(2), 296–302.
- Montagne, A., Nation, D. A., Pa, J., Sweeney, M. D., Toga, A. W., & Zlokovic, B. V. (2016). Brain imaging of neurovascular dysfunction in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 131(5), 687–707.
- Montine, T. J., Koroshetz, W. J., Babcock, D., Dickson, D. W., Galpern, W. R., Maria Glymour, M., Greenberg, S. M., Hutton, M. L., Knopman, D. S., Kuzmichev, A. N., Manly, J. J., Marder, K. S., Miller, B. L., Phelps, C. H., Seeley, W. W., Sieber, B. A., Silverberg, N. B., Sutherland, M., Torborg, C. L., ... Corriveau, R. A. (2014). Recommendations of the Alzheimer's disease-related dementias conference. *Neurology*, 83(9), 851–860.
- Morita, M., Gravel, S. P., Chénard, V., Sikström, K., Zheng, L., Alain, T., Gandin, V., Avizonis, D., Arguello, M., Zakaria, C., McLaughlan, S., Nouet, Y., Pause, A., Pollak, M., Gottlieb, E., Larsson, O., St-Pierre, J., Topisirovic, I., & Sonenberg, N. (2013). MTORC1 controls mitochondrial activity and biogenesis through 4E-BP-dependent translational regulation. *Cell Metabolism*, 18(5), 698–711.
- Morita, M., Gravel, S. P., Hulea, L., Larsson, O., Pollak, M., St-Pierre, J., & Topisirovic, I. (2015). MTOR coordinates protein synthesis, mitochondrial activity and proliferation. *Cell Cycle*, 14(4), 473–480.
- Muche, A., Bürger, S., Arendt, T., & Schliebs, R. (2015). Hypoxic stress, brain vascular system, and β-amyloid: A primary cell culture study. *Nutritional Neuroscience*, 18(1), 1–11.
- Naj, A. C., Jun, G., Beecham, G. W., Wang, L., Narayan, B., Buross, J., Gallins, P. J., Buxbaum, J. D., Jarvik, G. P., Crane, P. K., Larson, E. B., Bird, T. D., Boeve, B. F., & Graff, N. R. (2011). NIH Public Access EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease. *Nature Genetics*, 43(5), 436–441.
- Naugler, W. E., & Karin, M. (2008). NF-κB and cancer - Identifying targets and mechanisms. *Current Opinion in Genetics and Development*, 18(1), 19–26.
- Nayak, D., Roth, T. L., & McGavern, D. B. (2014). Microglia development and function. *Annual Review of Immunology*, 32(1), 367–402.
- Nelson, A. R., Sweeney, M. D., Sagare, A. P., & Zlokovic, B. V. (2016). Neurovascular dysfunction and neurodegeneration in dementia and Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1862(5), 887–900.



## BIBLIOGRAFÍA

- Nickel, D., Busch, M., Mayer, D., Hagemann, B., Knoll, V., & Stenger, S. (2012). Hypoxia triggers the expression of human  $\beta$  defensin 2 and antimicrobial activity against mycobacterium tuberculosis in human macrophages. *The Journal of Immunology*, 188(8), 4001–4007.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., & Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Neuroforum*, 11(3), 95–96.
- Nishi, K., Oda, T., Takabuchi, S., Oda, S., Fukuda, K., Adachi, T., Semenza, G. L., Shingu, K., & Hirota, K. (2008). LPS induces hypoxia-inducible factor 1 activation in macrophage- differentiated cells in a reactive oxygen species-dependent manner. *Antioxidants and Redox Signaling*, 10(5), 983–995.
- Niwa, K., Kazama, K., Younkin, L., Younkin, S. G., Carlson, G. A., & Iadecola, C. (2002a). Cerebrovascular autoregulation is profoundly impaired in mice overexpressing amyloid precursor protein. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 283(1), 315–323.
- Niwa, K., Kazama, K., Younkin, S. G., Carlson, G. A., & Iadecola, C. (2002b). Alterations in cerebral blood flow and glucose utilization in mice overexpressing the amyloid precursor protein. *Neurobiology of Disease*, 9(1), 61–68.
- Nortley, R., Korte, N., Izquierdo, P., Hirunpattarasilp, C., Mishra, A., Jaunmuktane, Z., Kyrargyri, V., Pfeiffer, T., Khennouf, L., Madry, C., Gong, H., Richard-Loendt, A., Huang, W., Saito, T., Saido, T. C., Brandner, S., Sethi, H., & Attwell, D. (2019). Amyloid  $\beta$  oligomers constrict human capillaries in Alzheimer's disease via signaling to pericytes. *Science*, 365(6450), eaav9518.
- O'Neill, L. A. J., & Pearce, E. J. (2016). Immunometabolism governs dendritic cell and macrophage function. *Journal of Experimental Medicine*, 213(1), 15–23.
- Orre, M., Kamphuis, W., Osborn, L. M., Jansen, A. H. P., Kooijman, L., Bossers, K., & Hol, E. M. (2014a). Isolation of glia from Alzheimer's mice reveals inflammation and dysfunction. *Neurobiology of Aging*, 35(12), 2746–2760.
- Orre, M., Kamphuis, W., Osborn, L. M., Melief, J., Kooijman, L., Huitinga, I., Klooster, J., Bossers, K., & Hol, E. M. (2014b). Acute isolation and transcriptome characterization of cortical astrocytes and microglia from young and aged mice. *Neurobiology of Aging*, 35(1), 1–14.
- Pan, R. Y., Ma, J., Kong, X. X., Wang, X. F., Li, S. S., Qi, X. L., Yan, Y. H., Cheng, J., Liu, Q., Jin, W., Tan, C. H., & Yuan, Z. (2019). Sodium rutin ameliorates Alzheimer's disease-like pathology by enhancing microglial amyloid- $\beta$  clearance. *Science Advances*, 5(2), 1-15.
- Papandreou, I., Cairns, R. A., Fontana, L., Lim, A. L., & Denko, N. C. (2006). HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metabolism*, 3(3), 187–197.
- Peers, C., Dallas, M. L., Boycott, H. E., Scragg, J. L., Pearson, H. A., & Boyle, J. P. (2009). Hypoxia and neurodegeneration. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1177, 169–177.
- Petzold, G. C., & Murthy, V. N. (2011). Role of astrocytes in neurovascular coupling. *Neuron*, 71(5), 782–797.
- Peyssonnaud, C., Cejudo-Martin, P., Doedens, A., Zinkernagel, A. S., Johnson, R. S., & Nizet, V. (2007). Cutting edge: Essential role of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  in development of



## BIBLIOGRAFÍA

- lipopolysaccharide-induced sepsis. *The Journal of Immunology*, 178(12), 7516–7519.
- Phipson, B., Lee, S., Majewski, I. J., Alexander, W. S., & Smyth, G. K. (2016). Robust hyperparameter estimation protects against hypervariable genes and improves power to detect differential expression. *The Annals of Applied Statistics*, 10(2), 946–963.
- Pimenova, A. A., Raj, T., & Goate, A. M. (2018). Untangling genetic risk for Alzheimer's disease. *Biological Psychiatry*, 83(4), 300–310.
- Pluta, R. (2002). Astroglial expression of the  $\beta$ -amyloid in ischemia-reperfusion brain injury. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 977, 102–108.
- Pluta, R., Jabłoński, M., Ułamek-Kozioł, M., Kocki, J., Brzozowska, J., Januszewski, S., Furmaga-Jabłońska, W., Bogucka-Kocka, A., Maciejewski, R., & Czuczwar, S. J. (2013). Sporadic Alzheimer's disease begins as episodes of brain ischemia and ischemically dysregulated Alzheimer's disease genes. *Molecular Neurobiology*, 48(3), 500–515.
- Puente-Santamaría, L., & Del Peso, L. (2018). TFEA.ChIP: a tool kit for transcription factor binding site enrichment analysis capitalizing on ChIP-seq datasets. *BioRxiv*, 303651.
- Rahman, S., & Islam, R. (2011). Mammalian Sirt1: Insights on its biological functions. *Cell Communication and Signaling*, 9(1), 11.
- Raleigh, J. A., Chou, S.-C., Arteel, G. E., & Horsman, M. R. (1999). Comparisons among pimonidazole binding, oxygen electrode measurements, and radiation response in C3H mouse tumors. *Radiation Research*, 151(5), 580–589.
- Rambold, A. S., Kostecky, B., Elia, N., & Lippincott-Schwartz, J. (2011). Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(25), 10190–10195.
- Ransohoff, R. M. (2016). A polarizing question: Do M1 and M2 microglia exist? *Nature Neuroscience*, 19(8), 987–991.
- Ransohoff, R. M., & El Khoury, J. (2016). Microglia in health and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(1), 1–15.
- Ransohoff, R. M., & Perry, V. H. (2009). Microglial physiology: Unique stimuli, specialized responses. *Annual Review of Immunology*, 27(1), 119–145.
- Rehwinkel, J., Tan, C. P., Goubau, D., Schulz, O., Pichlmair, A., Bier, K., Robb, N., Vreede, F., Barclay, W., Fodor, E., & Reis e Sousa, C. (2010). RIG-I detects viral genomic RNA during negative-strand RNA virus infection. *Cell*, 140(3), 397–408.
- Reitz, C., & Mayeux, R. (2014). Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochemical Pharmacology*, 88(4), 640–651.
- Río-Hortega, P. (1919). El “tercer elemento” de los centros nerviosos. I. La microglía en estado normal. II. Intervención de la microglía en los procesos patológicos (células en bastoncito y cuerpos gránulo-adiposos). *Boletín de La Sociedad Española de Biología*, VIII, 69–103.
- Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., & Smyth, G. K. (2015). Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids*





## BIBLIOGRAFÍA

- Research*, 43(7), e47.
- Rodríguez, J., Pilkington, R., García Muñoz, A., Nguyen, L. K., Rauch, N., Kennedy, S., Monsefi, N., Herrero, A., Taylor, C. T., & von Kriegsheim, A. (2016). Substrate-trapped interactors of PHD3 and FIH cluster in distinct signaling pathways. *Cell Reports*, 14(11), 2745–2760.
- Roiniotis, J., Dinh, H., Masendycz, P., Turner, A., Elsegood, C. L., Scholz, G. M., & Hamilton, J. A. (2009). Hypoxia prolongs monocyte/macrophage survival and enhanced glycolysis is associated with their maturation under aerobic conditions. *The Journal of Immunology*, 182(12), 7974–7981.
- Ruitenbergh, A., Den Heijer, T., Bakker, S. L. M., Van Swieten, J. C., Koudstaal, P. J., Hofman, A., & Breteler, M. M. B. (2005). Cerebral hypoperfusion and clinical onset of dementia: The Rotterdam study. *Annals of Neurology*, 57(6), 789–794.
- Rusanen, M., Ngandu, T., Laatikainen, T., Tuomilehto, J., Soininen, H., & Kivipelto, M. (2013). Chronic obstructive pulmonary disease and asthma and the risk of mild cognitive impairment and dementia: a population based CAIDE study. *Current Alzheimer Research*, 10(5), 549–555.
- Ryan, H. E., Poloni, M., McNulty, W., Elson, D., Gassmann, M., Arbeit, J. M., & Johnson, R. S. (2000). Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  is a positive factor in solid tumor growth. *Cancer Research*, 60(15), 4010–4015.
- Rybnikova, E., Gluschenko, T., Galeeva, A., Tulkova, E., Nalivaeva, N. N., Makova, N. Z., Turner, A. J., & Samoilov, M. (2012). Differential expression of ADAM15 and ADAM17 metalloproteases in the rat brain after severe hypobaric hypoxia and hypoxic preconditioning. *Neuroscience Research*, 72(4), 364–373.
- Saadi, S., Wrenshall, L. E., & Platt, J. L. (2002). Regional manifestations and control of the immune system. *FASEB Journal*, 16(8), 849–856.
- Sala-Frigerio, C., Wolfs, L., Fattorelli, N., Thrupp, N., Voytyuk, I., Schmidt, I., Mancuso, R., Chen, W. T., Woodbury, M. E., Srivastava, G., Möller, T., Hudry, E., Das, S., Saido, T., Karran, E., Hyman, B., Perry, V. H., Fiers, M., & De Strooper, B. (2019). The major risk factors for Alzheimer's disease: age, sex, and genes modulate the microglia response to A $\beta$  plaques. *Cell Reports*, 27(4), 1293–1306.
- Salminen, A., Kauppinen, A., & Kaarniranta, K. (2017). Hypoxia/ischemia activate processing of Amyloid Precursor Protein: impact of vascular dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 140(4), 536–549.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Sánchez-García, M. A. (2018). Hypoxia and Alzheimer's disease: The processing of amyloid precursor protein and the role of prolyl-hydroxylase 3 in microglia. *Tesis doctoral, Universidad de Sevilla*.
- Saura, J., Tusell, J. M., & Serratos, J. (2003). High-yield isolation of murine microglia by mild trypsinization. *Glia*, 44(3), 183–189.
- Schmolke, M., Patel, J. R., de Castro, E., Sánchez, M. T. A., Uccellini, M. B., Miller, J. C., Manicassamy,



## BIBLIOGRAFÍA

- B., Satoh, T., Kawai, T., Akira, S., Merad, M., & García-Sastre, A. (2014). RIG-I detects mRNA of intracellular *Salmonella enterica* serovar typhimurium during bacterial infection. *MBio*, 5(2), 1006–1014.
- Schofield, C. J., & Ratcliffe, P. J. (2004). Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(5), 343–354.
- Schor, H., Vaday, G. G., & Lider, O. (2000). Modulation of leukocyte behavior by an inflamed extracellular matrix. *Developmental Immunology*, 7(2–4), 227–238.
- Semenza, G. L. (2011). Oxygen Sensing, Homeostasis, and Disease. *New England Journal of Medicine*, 365, 537–547.
- Semenza, G. L. (2012a). Hypoxia-inducible factors: Mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends in Pharmacological Sciences*, 33(4), 207–214.
- Semenza, G. L. (2012b). Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell*, 148(3), 399–408.
- Sengillo, J. D., Winkler, E. A., Walker, C. T., Sullivan, J. S., Johnson, M., & Zlokovic, B. V. (2013). Deficiency in mural vascular cells coincides with blood-brain barrier disruption in Alzheimer's disease. *Brain Pathology*, 23(3), 303–310.
- Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Masliah, E., & Hyman, B. T. (2011). Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1(1), 1–23.
- Serrano-Pozo, A., Muzikansky, A., Gómez-Isla, T., Growdon, J. H., Betensky, R. A., Frosch, M. P., & Hyman, B. T. (2013). Differential relationship of reactive astrocytes and microglia to fibrillar amyloids deposits in Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 72(6), 462–471.
- Serrano-Pozo, A., Sánchez-García, M. A., Heras-Garvín, A., March-Díaz, R., Navarro, V., Vizuete, M., López-Barneo, J., Vitorica, J., & Pascual, A. (2017). Acute and chronic sustained hypoxia do not substantially regulate amyloid- $\beta$  peptide generation in vivo. *PLoS ONE*, 12(1), 1–17.
- Sheline, Y. I., Morris, J. C., Snyder, A. Z., Price, J. L., Yan, Z., D'Angelo, G., Liu, C., Dixit, S., Benzinger, T., Fagan, A., Goate, A., & Mintun, M. A. (2010). APOE4 allele disrupts resting state fMRI connectivity in the absence of amyloid plaques or decreased CSF A $\beta$ 42. *Journal of Neuroscience*, 30(50), 17035–17040.
- Shiota, S., Takekawa, H., Matsumoto, S. E., Takeda, K., Nurwidya, F., Yoshioka, Y., Takahashi, F., Hattori, N., Tabira, T., Mochizuki, H., & Takahashi, K. (2013). Chronic intermittent hypoxia/reoxygenation facilitate amyloid- $\beta$  generation in mice. *Journal of Alzheimer's Disease*, 37(2), 325–333.
- Sica, A., & Mantovani, A. (2012). Macrophages plasticity and polarization: in vivo veritas. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(3), 787–795.
- Snyder, H. M., Corriveau, R. A., Craft, S., Faber, J. E., Greenberg, S., Knopman, D., Lamb, B. T., Montine, T., Nedergaard, M., Schaffer, C. B., Schneider, J. A., Wellington, C., Wilcock, D. M., Zipfel, G. J., Zlokovic, B., Bain, L. J., Bosetti, F., Galis, Z. S., Koroshetz, W., & Carrillo, M. C. (2015). Vascular contributions to cognitive impairment and dementia including Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia*, 11(6), 710–717.





## BIBLIOGRAFÍA

- Spangenberg, E., Severson, P. L., Hohsfield, L. A., Crapser, J., Zhang, J., Burton, E. A., Zhang, Y., Spevak, W., Lin, J., Phan, N. Y., Habets, G., Rymar, A., Tsang, G., Walters, J., Nespi, M., Singh, P., Broome, S., Ibrahim, P., Zhang, C., ... Green, K. N. (2019). Sustained microglial depletion with CSF1R inhibitor impairs parenchymal plaque development in an Alzheimer's disease model. *Nature Communications*, 10(1), 1–21.
- Stelzmann, R. A., Norman-Schnitzlein, H., & Reed-Murtagh, F. (1995). An english translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige erkankung der hirnrinde." *Clinical Anatomy*, 8(6), 429–431.
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S., & Mesirov, J. P. (2005). Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(43), 15545–15550.
- Sun, X., He, G., Qing, H., Zhou, W., Dobie, F., Cai, F., Staufenbiel, M., Huang, L. E., & Song, W. (2006). Hypoxia facilitates Alzheimer's disease pathogenesis by up-regulating BACE1 gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(49), 18727–18732.
- Swain, L., Wottawa, M., Hillemann, A., Beneke, A., Odagiri, H., Terada, K., Endo, M., Oike, Y., Farhat, K., & Katschinski, D. M. (2014). Prolyl-4-hydroxylase domain 3 (PHD3) is a critical terminator for cell survival of macrophages under stress conditions. *Journal of Leukocyte Biology*, 96(3), 365–375.
- Sweeney, M. D., Sagare, A. P., & Zlokovic, B. V. (2015). Cerebrospinal fluid biomarkers of neurovascular dysfunction in mild dementia and Alzheimer's disease. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 35(7), 1055–1068.
- Sweeney, M. D., Sagare, A. P., & Zlokovic, B. V. (2018). Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Neurology*, 14(3), 133–150.
- Takeda, K., Ho, V. C., Takeda, H., Duan, L. J., Nagy, A., & Fong, G. H. (2006). Placental but not heart defects are associated with elevated hypoxia-inducible factor  $\alpha$  levels in mice lacking prolyl hydroxylase domain protein 2. *Molecular and Cellular Biology*, 26(22), 8336–8346.
- Taniguchi, C. M., Finger, E. C., Krieg, A. J., Wu, C., Diep, A. N., Lagory, E. L., Wei, K., McGinnis, L. M., Yuan, J., Kuo, C. J., & Giaccia, A. J. (2013). Cross-talk between hypoxia and insulin signaling through Phd3 regulates hepatic glucose and lipid metabolism and ameliorates diabetes. *Nature Medicine*, 19(10), 1325–1330.
- Tanimoto, K. (2000). Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *EMBO Journal*, 19(16), 4298–4309.
- Taylor, C. T. (2008). Interdependent roles for hypoxia inducible factor and nuclear factor- $\kappa$ B in hypoxic inflammation. *Journal of Physiology*, 586(17), 4055–4059.
- Taylor, J. M., Minter, M. R., Newman, A. G., Zhang, M., Adlard, P. A., & Crack, P. J. (2014). Type-1 interferon signaling mediates neuro-inflammatory events in models of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 35(5), 1012–1023.
- Thal, D. R., Griffin, W. S. T., de Vos, R. A. I., & Ghebremedhin, E. (2008). Cerebral amyloid angiopathy



## BIBLIOGRAFÍA

- and its relationship to Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 115(6), 599–609.
- Toledo, J. B., Cairns, N. J., Da, X., Chen, K., Carter, D., Fleisher, A., Householder, E., Ayutyanont, N., Roontiva, A., Bauer, R. J., Eisen, P., Shaw, L. M., Davatzikos, C., Weiner, M. W., Reiman, E. M., Morris, J. C., & Trojanowski, J. Q. (2013). Clinical and multimodal biomarker correlates of ADNI neuropathological findings. *Acta Neuropathologica Communications*, 1(1), 65.
- Tooyama, I., Kimura, H., Akiyama, H., & McGeer, P. L. (1990). Reactive microglia express class I and class II major histocompatibility complex antigens in Alzheimer's disease. *Brain Research*, 523(2), 273–280.
- Turner, L., Scotton, C., Negus, R., & Balkwill, F. (1999). Hypoxia inhibits macrophage migration. *European Journal of Immunology*, 29(7), 2280–2287.
- Ulland, T. K., Song, W. M., Huang, S. C. C., Ulrich, J. D., Sergushichev, A., Beatty, W. L., Loboda, A. A., Zhou, Y., Cairns, N. J., Kambal, A., Loginicheva, E., Gilfillan, S., Cella, M., Virgin, H. W., Unanue, E. R., Wang, Y., Artyomov, M. N., Holtzman, D. M., & Colonna, M. (2017). TREM2 maintains microglial metabolic fitness in Alzheimer's disease. *Cell*, 170(4), 649–663.
- Vallabhapurapu, S., & Karin, M. (2009). Regulation and function of NF-κB transcription factors in the immune system. *Annual Review of Immunology*, 27(1), 693–733.
- Vasek, M. J., Garber, C., Dorsey, D., Durrant, D. M., Bollman, B., Soung, A., Yu, J., Pérez-Torres, C., Frounin, A., Wilton, D. K., Funk, K., DeMasters, B. K., Jiang, X., Bowen, J. R., Mennerick, S., Robinson, J. K., Garbow, J. R., Tyler, K. L., Suthar, M. S., ... Klein, R. S. (2016). A complement-microglial axis drives synapse loss during virus- induced memory impairment. *Nature*, 534(7608), 538–543.
- Vera-Álvarez, R., Medeiros Vidal, N., Garzón-Martínez, G. A., Barrero, L. S., Landsman, D., & Mariño-Ramírez, L. (2017). Workflow and web application for annotating NCBI BioProject transcriptome data. *Database : The Journal of Biological Databases and Curation*, 2017, 1–10.
- Verdin, E. (2014). The many faces of sirtuins: Coupling of NAD metabolism, sirtuins and lifespan. *Nature Medicine*, 20(1), 25–27.
- Wake, H., Moorhouse, A. J., Jinno, S., Kohsaka, S., & Nabekura, J. (2009). Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *Journal of Neuroscience*, 29(13), 3974–3980.
- Wälchli, T., Mateos, J. M., Weinman, O., Babic, D., Regli, L., Hoerstrup, S. P., Gerhardt, H., Schwab, M. E., & Vogel, J. (2014). Quantitative assessment of angiogenesis, perfused blood vessels and endothelial tip cells in the postnatal mouse brain. *Nature Protocols*, 10(1), 53–74.
- Walmsley, S. R., Chilvers, E. R., Thompson, A. A., Vaughan, K., Marriott, H. M., Parker, L. C., Shaw, G., Parmar, S., Schneider, M., Sabroe, I., Dockrell, D. H., Milo, M., Taylor, C. T., Johnson, R. S., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J., Maxwell, P. H., Carmeliet, P., & Whyte, M. K. B. (2011). Prolyl hydroxylase 3 (PHD3) is essential for hypoxic regulation of neutrophilic inflammation in humans and mice. *Journal of Clinical Investigation*, 121(3), 1053–1063.
- Wang, H., Megill, A., He, K., Kirkwood, A., & Lee, H. K. (2012). Consequences of inhibiting amyloid precursor protein processing enzymes on synaptic function and plasticity. *Neural Plasticity*, 2012, 1–24.



## BIBLIOGRAFÍA

- Wang, R., Zhang, Y. W., Zhang, X., Liu, R., Zhang, X., Hong, S., Xia, K., Xia, J., Zhang, Z., & Xu, H. (2006). Transcriptional regulation of APH-1A and increased  $\gamma$ -secretase cleavage of APP and Notch by HIF-1 and hypoxia. *FASEB Journal*, 20(8), 1275–1277.
- Wang, Y., Cella, M., Mallinson, K., Ulrich, J. D., Young, K. L., Robinette, M. L., Gilfillan, S., Krishnan, G. M., Sudhakar, S., Zinselmeyer, B. H., Holtzman, D. M., Cirrito, J. R., & Colonna, M. (2015). TREM2 lipid sensing sustains the microglial response in an Alzheimer's disease model. *Cell*, 160(6), 1061–1071.
- Wang, Y., Ulland, T. K., Ulrich, J. D., Song, W., Tzaferis, J. A., Hole, J. T., Yuan, P., Mahan, T. E., Shi, Y., Gilfillan, S., Cella, M., Grutzendler, J., DeMattos, R. B., Cirrito, J. R., Holtzman, D. M., & Colonna, M. (2016). TREM2-mediated early microglial response limits diffusion and toxicity of amyloid plaques. *Journal of Experimental Medicine*, 213(5), 667–675.
- Wardlaw, J. M., Smith, E. E., Biessels, G. J., Cordonnier, C., Fazekas, F., Frayne, R., Lindley, R. I., O'Brien, J. T., Barkhof, F., Benavente, O. R., Black, S. E., Brayne, C., Breteler, M., Chabriat, H., DeCarli, C., de Leeuw, F. E., Doubal, F., Duering, M., Fox, N. C., ... Dichgans, M. (2013). Neuroimaging standards for research into small vessel disease and its contribution to ageing and neurodegeneration. *Lancet Neurology*, 12(8), 822–838.
- Weber, M., Gawanbacht, A., Habjan, M., Rang, A., Borner, C., Schmidt, A. M., Veitinger, S., Jacob, R., Devignot, S., Kochs, G., García-Sastre, A., & Weber, F. (2013). Incoming RNA virus nucleocapsids containing a 5'-triphosphorylated genome activate RIG-I and antiviral signaling. *Cell Host and Microbe*, 13(3), 336–346.
- Webster, N. J., Green, K. N., Settle, V. J., Peers, C., & Vaughan, P. F. T. (2004). Altered processing of the amyloid precursor protein and decreased expression of ADAM 10 by chronic hypoxia in SH-SY5Y: No role for the stress-activated JNK and p38 signalling pathways. *Molecular Brain Research*, 130(1–2), 161–169.
- Weichhart, T., Hengstschläger, M., & Linke, M. (2015). Regulation of innate immune cell function by mTOR. *Nature Reviews Immunology*, 15(10), 599–614.
- Wendeln, A.-C., Degenhardt, K., Kaurani, L., Gertig, M., Ulas, T., Jain, G., Wagner, J., Häslér, L. M., Wild, K., Skodras, A., Blank, T., Staszewski, O., Datta, M., Pena-Centeno, T., Capece, V., Islam, R., Kerimoglu, C., Staufienbiel, M., Schultze, J., ... Neher, J. J. (2018). Innate immune memory in the brain shapes neurological disease hallmarks. *Nature*, 556(7701), 332–338.
- Wes, P. D., Holtzman, I. R., Boddeke, E. W. G. M., Möller, T., & Eggen, B. J. L. (2016). Next generation transcriptomics and genomics elucidate biological complexity of microglia in health and disease. *Glia*, 64(2), 197–213.
- Wierenga, C. E., Hays, C. C., & Zlatar, Z. Z. (2014). Cerebral blood flow measured by arterial spin labeling MRI as a preclinical marker of alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 42(4), 411–419.
- Wolf, S. A., Boddeke, H. W. G. M., & Kettenmann, H. (2017). Microglia in physiology and disease. *Annual Review of Physiology*, 79(1), 619–643.
- Wu, L., Rosa-Neto, P., Hsiung, G. R., Sadovnick, A. D., Masellis, M., Black, S. E., Jia, J., & Gauthier, S. (2012). Early-onset familial Alzheimer's disease (EOFAD). *Canadian Journal of Neurological Sciences*, 39(4), 436–445.



## BIBLIOGRAFÍA

- Wu, Z., Guo, H., Chow, N., Sallstrom, J., Bell, R. D., Deane, R., Brooks, A. I., Kanagala, S., Rubio, A., Sagare, A., Liu, D., Li, F., Armstrong, D., Gasiewicz, T., Zidovetzki, R., Song, X., Hofman, F., & Zlokovic, B. V. (2005). Role of the MEOX2 homeobox gene in neurovascular dysfunction in Alzheimer disease. *Nature Medicine*, 11(9), 959–965.
- Xue, J., Schmidt, S. V., Sander, J., Draffehn, A., Krebs, W., Quester, I., DeNardo, D., Gohel, T. D., Emde, M., Schmidleithner, L., Ganesan, H., Nino-Castro, A., Mallmann, M. R., Labzin, L., Theis, H., Kraut, M., Beyer, M., Latz, E., Freeman, T. C., ... Schultze, J. L. (2014). Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity*, 40(2), 274–288.
- Yaffe, K., Laffan, A. M., Harrison, S. L., Spira, A. P., Ensrud, K. E., & Ancoli-Israel, S. (2011). Sleep disordered breathing, hypoxia, and risk of mild cognitive impairment and dementia in older women. *Jama*, 306(6), 613–619.
- Yokogami, K., Wakisaka, S., Avruch, J., & Reeves, S. A. (2000). Serine phosphorylation and maximal activation of STAT3 during CNTF signaling is mediated by the rapamycin target mTOR. *Current Biology*, 10(1), 47–50.
- Yona, S., Kim, K.-W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., Strauss-Ayali, D., Viukov, S., Williams, M., Misharin, A., Hume, D. A., Perlman, H., Malissen, B., Zelzer, E., & Jung, S. (2013). Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity*, 38(1), 79–91.
- Yoon, H., Shin, S. H., Shin, D. H., Chun, Y. S., & Park, J. W. (2014). Differential roles of Sirt1 in HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  mediated hypoxic responses. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 444(1), 36–43.
- York, A. G., Williams, K. J., Argus, J. P., Zhou, Q. D., Brar, G., Vergnes, L., Gray, E. E., Zhen, A., Wu, N. C., Yamada, D. H., Cunningham, C. R., Tarling, E. J., Wilks, M. Q., Casero, D., Gray, D. H., Yu, A. K., Wang, E. S., Brooks, D. G., Sun, R., ... Bensinger, S. J. (2015). Limiting cholesterol biosynthetic flux spontaneously engages type I IFN signaling. *Cell*, 163(7), 1716–1729.
- Yoshiyama, Y., Higuchi, M., Zhang, B., Huang, S. M., Iwata, N., Saido, T. C. C., Maeda, J., Suhara, T., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. Y. (2007). Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. *Neuron*, 53(3), 337–351.
- Yuan, P., Condello, C., Keene, C. D., Wang, Y., Bird, T. D., Paul, S. M., Luo, W., Colonna, M., Baddeley, D., & Grutzendler, J. (2016). TREM2 haploinsufficiency in mice and humans impairs the microglia barrier function leading to decreased amyloid compaction and severe axonal dystrophy. *Neuron*, 90(4), 724–739.
- Zeisel, A., Muñoz-Manchado, A. B., Codeluppi, S., Lönnerberg, P., La-Manno, G., Juréus, A., Marques, S., Munguba, H., He, L., Betsholtz, C., Rolny, C., Branco-Castelo, G., Hjerling-Leffler, J., & Linnarsson, S. (2015). Cell types in the mouse cortex and hippocampus revealed by single-cell RNA-seq. *Science*, 347(6226), 1138–1142.
- Zhang, Q., Gu, J., Li, L., Liu, J., Luo, B., Cheung, H.-W., Boehm, J. S., Ni, M., Geisen, C., Root, D. E., Polyak, K., Brown, M., Richardson, A. L., Hahn, W. C., Kaelin, W. G., & Bommi-Reddy, A. (2009). Control of Cyclin D1 and breast tumorigenesis by the EglN2 prolyl hydroxylase. *Cancer Cell*, 16(5), 413–424.



## BIBLIOGRAFÍA

- Zhang, X., Zhou, K., Wang, R., Cui, J., Lipton, S. A., Liao, F. F., Xu, H., & Zhang, Y. W. (2007). Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ )-mediated hypoxia increases BACE1 expression and  $\beta$ -amyloid generation. *Journal of Biological Chemistry*, 282(15), 10873–10880.
- Zhang, Y., Chen, K., Sloan, S. A., Bennett, M. L., Scholze, A. R., O’Keeffe, S., Phatnani, H. P., Guarnieri, P., Caneda, C., Ruderisch, N., Deng, S., Liddelow, S. A., Zhang, C., Daneman, R., Maniatis, T., Barres, B. A., & Wu, J. Q. (2014). An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *Journal of Neuroscience*, 34(36), 11929–11947.
- Zheng, X., Zhai, B., Koivunen, P., Shin, S. J., Lu, G., Liu, J., Geisen, C., Chakraborty, A. a., Moslehi, J. J., Smalley, D. M., Wei, X., Chen, X., Chen, Z., Beres, J. M., Zhang, J., Tsao, J. L., Brenner, M. C., Zhang, Y., Fan, C., ... Zhang, Q. (2014). Prolyl hydroxylation by EglN2 destabilizes FOXO3a by blocking its interaction with the USP9x deubiquitinase. *Genes and Development*, 28(13), 1429–1444.
- Zhou, J., Schmid, T., & Brüne, B. (2003). Tumor necrosis factor- $\alpha$  causes accumulation of a ubiquitinated form of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  through a nuclear factor- $\kappa$ B-dependent pathway. *Molecular Biology of the Cell*, 14, 2216–2225.
- Zlokovic, B. V. (2011). Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer’s disease and other disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, 12(12), 723–738.
- Zünd, G., Uezono, S., Stahl, G. L., Dzus, A. L., McGowan, F. X., Hickey, P. R., & Colgan, S. P. (1997). Hypoxia enhances induction of endothelial ICAM-1: Role for metabolic acidosis and proteasomes. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 273(5), 1571–1580.



## ANEXOS

ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**000008745e2000018471**

CSV

**GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular**



GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

ÁMBITO- PREFIJO

**GEISER**

Nº registro

**000008745e2000018471**

CSV

**GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07**

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

**<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>**

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

**29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular**



GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07



## 9. ANEXOS

### 9.1. TABLAS SUPLEMENTARIAS

#### Tabla suplementaria 1

**Tabla suplementaria 1. Factores de transcripción enriquecidos en la AβAM.** Factores de transcripción que se encuentran aumentados en la microglía aislada mediante FACS de ratones *APP-PSEN1* de 12 meses de edad.

Accession	Cell	Treatment	Transcription factor	p	OR	log2.OR	adj.p. value	log10.adj. p.value	Distance
GSM1056836	macrophage	4h 1% O <sub>2</sub>	HIF2a	0.00000	1.83813	0.87824	0.00000	6.83	6.88
GSM1218849	myoblast	none	MYOD1	0.00000	1.78715	0.83766	0.00000	6.35	6.41
wgEncodeEH001772	MCF10A-Er-Src	EtOH 0.01pct	STAT3	0.00000	1.70201	0.76724	0.00000	6.35	6.40
GSM1218850	myotube	none	MYOD1	0.00000	1.79671	0.84536	0.00000	5.97	6.03
wgEncodeEH001769	MCF10A-Er-Src	4OHTAM 1μM 36h	STAT3	0.00000	1.67032	0.74012	0.00000	5.86	5.91
GSM1208631	LoVo	none	HINFP	0.00000	1.76647	0.82087	0.00000	5.78	5.84
wgEncodeEH001491	A549	DEX 50nM	NR3C1	0.00000	1.62193	0.69771	0.00000	5.70	5.75
wgEncodeEH001820	HeLa-S3	none	EP300	0.00000	1.62141	0.69725	0.00000	5.70	5.75
GSM1056831	macrophage	4h 1% O <sub>2</sub>	HIF1a	0.00000	2.04816	1.03433	0.00000	5.34	5.44
wgEncodeEH002836	MCF10A-Er-Src	4OHTAM 1μM12h	STAT3	0.00000	1.60048	0.67851	0.00000	5.34	5.38
wgEncodeEH001868	MCF10A-Er-Src	EtOH 0.01pct 12h	STAT3	0.00000	1.57160	0.65223	0.00001	4.87	4.91
wgEncodeEH001871	MCF10A-Er-Src	EtOH 0.01pct 4h	STAT3	0.00000	1.57203	0.65263	0.00002	4.82	4.86
GSE92067	HEK293	none	HIC1	0.00000	1.54985	0.63213	0.00003	4.54	4.59
GSM1056835	macrophage	4h 1% O <sub>2</sub>	HIF2a	0.00000	2.06339	1.04502	0.00006	4.26	4.38
GSM1407630	HEK293	none	ZNF189	0.00000	1.52475	0.60857	0.00005	4.33	4.37
wgEncodeEH001832	GM12878	none	EBF1	0.00000	1.52113	0.60514	0.00006	4.24	4.28
GSE91851	HEK293	none	GLIS2	0.00000	1.66399	0.73465	0.00008	4.08	4.15
wgEncodeEH001799	HeLa-S3	none	STAT3	0.00000	1.55502	0.63694	0.00008	4.09	4.14
GSM1056832	macrophage	4h 1% O <sub>2</sub>	HIF1a	0.00000	1.53313	0.61648	0.00008	4.09	4.14

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

000008745e2000018471

CSV

GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>



GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular

182

Accession	Cell	Treatment	Transcription factor	p	OR	log2.OR	adj.p. value	log10.adj. p.value	Distance
GSM1919982	PDAC	none	KLF4	0.00000	1.78253	0.83393	0.00013	3.87	3.96
wgEncodeEH001817	HeLa-S3	none	PRDM1	0.00000	1.77398	0.82699	0.00013	3.87	3.96
wgEncodeEH002815	MCF10A-Er-Src	EtOH 0.01pct	FOS	0.00000	1.52490	0.60871	0.00013	3.87	3.92
wgEncodeEH002818	A549	none	CEBPB	0.00000	1.49981	0.58478	0.00013	3.87	3.92
wgEncodeEH000746	HeLa-S3	none	JUN	0.00000	1.48998	0.57529	0.00013	3.87	3.92
GSE91480	HEK293	none	PRDM1	0.00000	1.53390	0.61720	0.00015	3.83	3.88
GSM1218851	Rhabdomyo-sarcoma	none	MYOD1	0.00000	1.53341	0.61674	0.00016	3.79	3.84
GSM2026052	Kasumi	none	ERG	0.00001	2.06346	1.04506	0.00021	3.68	3.82
wgEncodeEH000668	K562	IFNg 6h	JUN	0.00001	1.57090	0.65159	0.00018	3.73	3.79
wgEncodeEH002807	IMR90	none	CEBPB	0.00001	1.53398	0.61728	0.00018	3.73	3.78
wgEncodeEH001774	HUVEC	none	FOS	0.00001	1.48485	0.57032	0.00018	3.73	3.78
GSM2026791	HEK293	none	ZNF134	0.00001	1.47528	0.56099	0.00020	3.71	3.75
wgEncodeEH001207	K562	none	FOS	0.00001	1.49981	0.58478	0.00021	3.68	3.73
wgEncodeEH003080	Dnd41	none	EZH2	0.00001	1.76886	0.82282	0.00031	3.50	3.60
wgEncodeEH000719	HUVEC	none	JUN	0.00001	1.45052	0.53657	0.00033	3.48	3.52
wgEncodeEH002304	HepG2	none	CEBPB	0.00001	1.44887	0.53493	0.00034	3.47	3.51
wgEncodeEH001480	GM12878	none	EBF1	0.00002	1.48495	0.57041	0.00038	3.42	3.47
GSM2026864	HEK293	none	ZNF341	0.00002	1.60121	0.67916	0.00042	3.38	3.45
GSM2026745	HEK293	none	ZBTB14	0.00002	1.54677	0.62926	0.00042	3.37	3.43
GSE91565	IMR90	none	NFE2L2	0.00002	1.46395	0.54987	0.00046	3.33	3.38
wgEncodeEH001821	K562	none	CEBPB	0.00002	1.46531	0.55120	0.00050	3.30	3.35
GSM1919983	PDAC	none	KLF6	0.00002	1.55757	0.63929	0.00054	3.27	3.33
wgEncodeEH002837	MCF10A-Er-Src	4OHTAM 1µM 12h	FOS	0.00003	1.49097	0.57626	0.00058	3.23	3.29
GSE96344	liver	none	FOXA1	0.00003	1.42472	0.51068	0.00069	3.16	3.20
GSE96327	K562	none	NR2F6	0.00003	1.42609	0.51206	0.00070	3.16	3.20
GSM1495182	U2OS	20 min heat shock	HSF1	0.00004	1.42502	0.51098	0.00070	3.16	3.20
wgEncodeEH002824	GM12878	none	EP300	0.00004	1.44964	0.53569	0.00072	3.14	3.19
GSM2390643	HUVEC	Hypoxia	ARNT	0.00005	1.76394	0.81880	0.00086	3.07	3.17
wgEncodeEH002838	MCF10A-Er-Src	4OHTAM 1µM 4h	FOS	0.00004	1.46332	0.54925	0.00077	3.11	3.16
wgEncodeEH002315	GM12878	none	TCF3	0.00004	1.41883	0.50470	0.00077	3.11	3.15

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

000008745e2000018471

CSV

GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>



GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular

183

Accession	Cell	Treatment	Transcription factor	p	OR	log2.OR	adj.p. value	log10.adj. p.value	Distance
wgEncodeEH001829	HepG2	none	CEBPB	0.00005	1.46383	0.54975	0.00088	3.06	3.10
wgEncodeEH000745	HeLa-S3	none	JUND	0.00005	1.41230	0.49805	0.00087	3.06	3.10
GSM1859069	Th1	none	MYB	0.00006	1.57193	0.65254	0.00095	3.02	3.09
GSM2026757	HEK293	none	ZBTB48	0.00010	2.19589	1.13480	0.00141	2.85	3.07
wgEncodeEH001486	GM12878	none	BCL11A	0.00005	1.41463	0.50042	0.00094	3.03	3.07
GSM2026815	HEK293	none	ZNF770	0.00007	1.61162	0.68851	0.00104	2.98	3.06
wgEncodeEH001658	GM12878	none	BCL3	0.00006	1.40962	0.49531	0.00095	3.02	3.06
wgEncodeEH002310	A549	EtOH 0.02pct	FOSL2	0.00006	1.40837	0.49402	0.00098	3.01	3.05
wgEncodeEH001841	HepG2	none	MAFF	0.00006	1.40772	0.49336	0.00098	3.01	3.05
GSE91894	A549	none	NFE2L2	0.00007	1.52071	0.60475	0.00104	2.98	3.05
wgEncodeEH002839	MCF10A-Er-Src	4OHTAM 1µM 36hr	FOS	0.00006	1.44410	0.53017	0.00101	3.00	3.04
wgEncodeEH002037	GM12878	none	EP300	0.00007	1.49955	0.58453	0.00104	2.98	3.04
GSM2026051	Kasumi	none	FLI1	0.00009	1.82683	0.86934	0.00128	2.89	3.02
wgEncodeEH001540	ECC-1	DEX 100nM	NR3C1	0.00008	1.47150	0.55729	0.00126	2.90	2.95
GSM1275921	U937	none	MIXL1	0.00011	1.41704	0.50288	0.00162	2.79	2.84
wgEncodeEH000753	HepG2	forskolin	HNF4A	0.00012	1.38999	0.47508	0.00171	2.77	2.81
GSE53041.8	LX2	none	VDR	0.00018	1.76254	0.81766	0.00241	2.62	2.74
GSM1693904	hTERT-RPE1	none	HINFP	0.00015	1.38255	0.46733	0.00203	2.69	2.73
GSE105587	GM12878	none	IKZF1	0.00018	1.54945	0.63176	0.00241	2.62	2.69
wgEncodeEH001501	HepG2	none	FOSL2	0.00016	1.38096	0.46567	0.00225	2.65	2.69
GSM830122	keratinocytes	3 days Ca2+	TP63	0.00018	1.41339	0.49916	0.00242	2.62	2.66
GSM700945	MCF-7	0.5%0 <sub>2</sub> 16h	HIF2a	0.00022	1.68482	0.75259	0.00279	2.55	2.66
GSM700944	MCF-7	0.5%0 <sub>2</sub> 16h	HIF1a	0.00030	2.02055	1.01475	0.00350	2.46	2.66
wgEncodeEH001781	HEK293-T-REx	none	ZNF263	0.00020	1.42207	0.50799	0.00251	2.60	2.65
wgEncodeEH001595	HepG2	none	HNF4A	0.00019	1.37379	0.45816	0.00249	2.60	2.64
wgEncodeEH001651	HepG2	none	HNF4G	0.00019	1.37268	0.45699	0.00251	2.60	2.64
GSE64233.1	SGBS	TNF	RELA	0.00026	1.62877	0.70378	0.00317	2.50	2.60
GSM1407644	HEK293	none	ZNF322	0.00023	1.39260	0.47779	0.00284	2.55	2.59
GSE91749	HEK293	none	ZEB2	0.00028	1.44427	0.53034	0.00339	2.47	2.53
wgEncodeEH001492	A549	DEX 5nM	NR3C1	0.00031	1.50542	0.59017	0.00366	2.44	2.51
GSM1084800	OCI-Ly7	none	BACH2	0.00029	1.37961	0.46426	0.00346	2.46	2.50

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

000008745e2000018471

CSV

GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida



GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular

ANEXOS

184

Accession	Cell	Treatment	Transcription factor	p	OR	log2.OR	adj.p. value	log10.adj. p.value	Distance
wgEncodeEH000983	HCPEpiC	none	CTCF	0.00034	1.51496	0.59928	0.00387	2.41	2.49
wgEncodeEH001801	HepG2	none	JUND	0.00032	1.35964	0.44323	0.00371	2.43	2.47
GSE91416	HEK293	none	ZNF600	0.00035	1.47128	0.55707	0.00394	2.40	2.47
wgEncodeEH000722	HeLa-S3	none	SMARCB1	0.00034	1.36266	0.44642	0.00386	2.41	2.45
GSM1438986	ICN12	none	BCL6	0.00038	1.37104	0.45527	0.00412	2.38	2.43
wgEncodeEH002346	K562	none	CEBPB	0.00038	1.35448	0.43774	0.00412	2.38	2.42
GSM1574275	PDAC	none	HNF1B	0.00037	1.35328	0.43646	0.00412	2.38	2.42
GSM2026793	HEK293	none	ZNF121	0.00043	1.43246	0.51850	0.00453	2.34	2.40
wgEncodeEH001663	K562	none	MEF2A	0.00043	1.41506	0.50086	0.00453	2.34	2.40
GSM1859068	Th1	none	MYB	0.00043	1.35691	0.44032	0.00453	2.34	2.38
wgEncodeEH000685	HeLa-S3	none	TFAP2A	0.00044	1.35116	0.43420	0.00461	2.34	2.38
GSM2026761	HEK293	none	ZNF35	0.00054	1.60011	0.67817	0.00550	2.26	2.36
wgEncodeEH002832	IMR90	none	MAFK	0.00048	1.34671	0.42944	0.00492	2.31	2.35
wgEncodeEH000630	K562	none	ZNF263	0.00055	1.46126	0.54721	0.00559	2.25	2.32
wgEncodeEH002298	HUVEC	none	POLR2A	0.00062	1.39674	0.48206	0.00586	2.23	2.28
GSM1693910	U2OS	none	HINFP	0.00060	1.35445	0.43771	0.00584	2.23	2.28
wgEncodeEH000686	HeLa-S3	none	TFAP2C	0.00059	1.35288	0.43603	0.00584	2.23	2.28
GSM2574796	GM12878	none	ETV6	0.00060	1.34084	0.42313	0.00584	2.23	2.27
wgEncodeEH001618	HepG2	none	HDAC2	0.00061	1.33916	0.42133	0.00585	2.23	2.27
GSM1443815	hMADS-3	none	KLF11	0.00063	1.35700	0.44042	0.00592	2.23	2.27
GSM1574276	PDAC	none	IRF1	0.00069	1.47281	0.55857	0.00631	2.20	2.27
wgEncodeEH001758	HUVEC	none	GATA2	0.00064	1.33790	0.41997	0.00598	2.22	2.26
wgEncodeEH000620	K562	none	JUN	0.00071	1.35262	0.43576	0.00633	2.20	2.24
wgEncodeEH001612	HepG2	none	EP300	0.00070	1.33941	0.42160	0.00633	2.20	2.24
wgEncodeEH001536	ECC-1	Estradiol 10nM	ESR1	0.00074	1.35217	0.43527	0.00650	2.19	2.23
wgEncodeEH000598	MCF-7	none	CTCF	0.00080	1.43884	0.52491	0.00691	2.16	2.22
wgEncodeEH001815	HeLa-S3	none	CEBPB	0.00083	1.38369	0.46852	0.00707	2.15	2.20
wgEncodeEH001794	HepG2	none	JUN	0.00083	1.37560	0.46006	0.00707	2.15	2.20
GSM1405082	HeLa	none	AFF4	0.00086	1.35679	0.44019	0.00718	2.14	2.19
wgEncodeEH002333	K562	none	TEAD4	0.00085	1.34149	0.42383	0.00716	2.14	2.19
wgEncodeEH002292	A549	EtOH 0.02pct	EP300	0.00090	1.34137	0.42371	0.00749	2.13	2.17
wgEncodeEH000562	GM12892	none	CTCF	0.00103	1.41895	0.50482	0.00834	2.08	2.14

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

000008745e2000018471

CSV

GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida



GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular

185

Accession	Cell	Treatment	Transcription factor	p	OR	log2.OR	adj.p.value	log10.adj.p.value	Distance
GSM1239460	LoVo	none	HOXA4	0.00101	1.32424	0.40517	0.00821	2.09	2.12
GSM1239461	LoVo	none	HOXA5	0.00101	1.32424	0.40517	0.00821	2.09	2.12
GSE92187	MCF7	none	ESRRA	0.00105	1.32855	0.40985	0.00841	2.08	2.12
GSM2026794	HEK293	none	ZNF121	0.00106	1.32947	0.41085	0.00847	2.07	2.11
wgEncodeEH002345	HepG2	none	TEAD4	0.00110	1.32583	0.40689	0.00867	2.06	2.10
wgEncodeEH001842	HepG2	none	MAFK	0.00112	1.32089	0.40151	0.00879	2.06	2.09
wgEncodeEH002821	A549	none	POLR2A	0.00126	1.46980	0.55562	0.00959	2.02	2.09
wgEncodeEH001565	GM12878	none	MEF2A	0.00113	1.31954	0.40004	0.00883	2.05	2.09
GSE96124	liver	none	NR2F2	0.00118	1.37547	0.45992	0.00910	2.04	2.09
GSM2466455	HEK293T	none	ZIK1	0.00651	2.70515	1.43571	0.03070	1.51	2.09
GSM830121	keratinocytes	none	TP63	0.00128	1.39057	0.47568	0.00961	2.02	2.07
GSE92043	K562	TNF	RELA	0.00133	1.42195	0.50787	0.00996	2.00	2.07
wgEncodeEH002812	MCF-7	none	GATA3	0.00127	1.35210	0.43520	0.00959	2.02	2.06
GSE96210	HepG2	none	NR2F6	0.00125	1.32112	0.40176	0.00958	2.02	2.06
GSE92083	K562	none	ARID1B	0.00136	1.34086	0.42316	0.00999	2.00	2.04
GSE53041.9	THP-1	80 min calcitriol	VDR	0.00189	1.69501	0.76129	0.01279	1.89	2.04
wgEncodeEH000980	AoAF	none	CTCF	0.00149	1.38600	0.47092	0.01059	1.98	2.03
wgEncodeEH001472	HepG2	none	USF1	0.00142	1.32020	0.40076	0.01033	1.99	2.03
GSM2257668	U2OS	none	ARNTL	0.00151	1.31624	0.39642	0.01070	1.97	2.01
wgEncodeEH001637	K562	none	FOSL1	0.00164	1.32389	0.40479	0.01153	1.94	1.98
GSE96114	liver	none	FOXA1	0.00167	1.32248	0.40325	0.01161	1.94	1.98
wgEncodeEH001485	GM12878	none	TCF12	0.00167	1.31164	0.39137	0.01161	1.94	1.97
GSM1443816	hMADS-3	none	KLF11	0.00181	1.35181	0.43489	0.01244	1.91	1.95
wgEncodeEH000402	WERI-Rb-1	none	CTCF	0.00193	1.37655	0.46105	0.01293	1.89	1.94
wgEncodeEH002547	HFF	none	CTCF	0.00187	1.34279	0.42524	0.01276	1.89	1.94
GSM1495181	U2OS	10 min heat shock	HSF1	0.00184	1.30535	0.38443	0.01262	1.90	1.94
wgEncodeEH001490	A549	DEX 500pM	NR3C1	0.02271	2.93606	1.55388	0.07145	1.15	1.93
GSM1443811	hMADS-3	none	PPARG	0.00214	1.40819	0.49384	0.01376	1.86	1.93
wgEncodeEH000750	HepG2	forskolin	CEBPB	0.00200	1.30161	0.38030	0.01322	1.88	1.92
wgEncodeEH002025	GM12878	none	BHLHE40	0.00200	1.29942	0.37787	0.01322	1.88	1.92
GSE91793	A549	none	ESRRA	0.00242	1.49452	0.57968	0.01502	1.82	1.91
GSM2026891	HEK293	none	ZNF281	0.00206	1.31749	0.39779	0.01349	1.87	1.91

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

000008745e2000018471

CSV

GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida



GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular

ANEXOS

186

Accession	Cell	Treatment	Transcription factor	p	OR	log2.OR	adj.p. value	log10.adj. p.value	Distance
wgEncodeEH000976	AG04450	none	CTCF	0.00220	1.37568	0.46014	0.01399	1.85	1.91
GSM2574795	GM12878	none	ETV6	0.00208	1.30578	0.38491	0.01358	1.87	1.91
GSM1443810	hMADS-3	none	PPARG	0.00213	1.30750	0.38681	0.01376	1.86	1.90
wgEncodeEH000647	HeLa-S3	none	FOS	0.00237	1.34049	0.42276	0.01481	1.83	1.88
GSE91422	HEK293	none	ZNF623	0.00247	1.29469	0.37260	0.01526	1.82	1.85
wgEncodeEH002036	MCF-7	none	ZNF217	0.00268	1.36231	0.44606	0.01630	1.79	1.84
GSE91730	K562	none	IKZF1	0.00359	1.64329	0.71658	0.02021	1.69	1.84
GSE101211	GM12878	none	CBX3	0.01847	2.56162	1.35706	0.06167	1.21	1.82
wgEncodeEH001861	HepG2	none	SMC3	0.00281	1.30614	0.38531	0.01696	1.77	1.81
GSM1239431	LoVo	none	MAFB	0.00766	2.07621	1.05395	0.03415	1.47	1.81
wgEncodeEH001132	MCF-7	vehicle	CTCF	0.00332	1.43848	0.52454	0.01907	1.72	1.80
wgEncodeEH002816	MCF10A-Er-Src	EtOH 0.01pct	MYC	0.00304	1.32006	0.40060	0.01816	1.74	1.79
wgEncodeEH000673	K562	IFNg 30	JUN	0.00311	1.32339	0.40424	0.01826	1.74	1.78
wgEncodeEH000110	HSMM	none	CTCF	0.00322	1.36314	0.44693	0.01883	1.73	1.78
GSM1239445	LoVo	none	NR5A2	0.00306	1.28773	0.36483	0.01819	1.74	1.78
wgEncodeEH000978	AG09319	none	CTCF	0.00333	1.36581	0.44976	0.01907	1.72	1.78
GSE96473	HepG2	none	GATAD2A	0.00331	1.34886	0.43175	0.01907	1.72	1.77
wgEncodeEH000120	NHLF	none	CTCF	0.00346	1.34097	0.42327	0.01967	1.71	1.76
wgEncodeEH001555	A549	DEX 100nM	NR3C1	0.00332	1.28525	0.36205	0.01907	1.72	1.76
GSM2574751	HepG2	none	FOXO3	0.00372	1.34431	0.42687	0.02083	1.68	1.73
wgEncodeEH001576	K562	none	GATA2	0.00359	1.28324	0.35980	0.02021	1.69	1.73
GSE91618	HepG2	none	FOXA1	0.00384	1.34733	0.43010	0.02121	1.67	1.73
GSM1443813	hMADS-3	none	KLF11	0.00385	1.33718	0.41919	0.02121	1.67	1.73
GSM2466520	HEK293T	none	ZNF287	0.01019	2.02561	1.01836	0.04114	1.39	1.72
wgEncodeEH001810	GM12878	none	RFX5	0.00428	1.40031	0.48575	0.02268	1.64	1.71
wgEncodeEH001850	HepG2	none	MAFK	0.00379	1.28111	0.35740	0.02111	1.68	1.71
GSM1443809	hMADS-3	none	PPARG	0.00387	1.29158	0.36913	0.02125	1.67	1.71
wgEncodeEH001627	HCT-116	none	POLR2A	0.00399	1.33145	0.41300	0.02179	1.66	1.71
wgEncodeEH003437	MCF-7	Serum starved media	CTCF	0.00414	1.35713	0.44056	0.02220	1.65	1.71
wgEncodeEH002056	HVMF	none	CTCF	0.00415	1.34625	0.42895	0.02220	1.65	1.71
wgEncodeEH001767	H1-hESC	none	CTBP2	0.00406	1.29287	0.37057	0.02203	1.66	1.70

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

000008745e2000018471

CSV

GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida



GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular

Accession	Cell	Treatment	Transcription factor	p	OR	log2.OR	adj.p. value	log10.adj. p.value	Distance
GSM1239462	LoVo	none	HOXA6	0.00410	1.29533	0.37332	0.02214	1.65	1.70
wgEncodeEH000977	AG09309	none	CTCF	0.00436	1.33071	0.41219	0.02299	1.64	1.69
wgEncodeEH001506	HepG2	none	RXRA	0.00420	1.27707	0.35283	0.02236	1.65	1.69
wgEncodeEH001560	H1-hESC	none	RXRA	0.00546	1.49598	0.58109	0.02682	1.57	1.68
GSE92035	HEK293	none	ZSCAN20	0.00440	1.27515	0.35067	0.02307	1.64	1.67
GSM1692868	ATCC HTB-96	none	ARNTL	0.00442	1.27472	0.35018	0.02307	1.64	1.67
wgEncodeEH001476	GM12878	none	SPI1	0.00457	1.30005	0.37857	0.02364	1.63	1.67
GSM1366686	keratinocytes	none	TP63	0.00451	1.27786	0.35373	0.02342	1.63	1.67
wgEncodeEH000975	AG04449	none	CTCF	0.00483	1.35683	0.44024	0.02475	1.61	1.67
wgEncodeEH001532	H1-hESC	none	USF1	0.00465	1.28082	0.35707	0.02393	1.62	1.66
wgEncodeEH000981	HBMEC	none	CTCF	0.00507	1.37015	0.45434	0.02535	1.60	1.66
wgEncodeEH001026	NH-A	none	CTCF	0.00490	1.30525	0.38433	0.02489	1.60	1.65
wgEncodeEH001650	HepG2	none	FOXA2	0.00494	1.28256	0.35903	0.02495	1.60	1.64
GSM2026878	HEK293	none	MYNN	0.00491	1.27017	0.34502	0.02489	1.60	1.64
GSE92194	HEK293	none	WT1	0.00504	1.27506	0.35056	0.02531	1.60	1.63
GSE105218	HepG2	none	FOXA2	0.00515	1.28721	0.36425	0.02562	1.59	1.63
wgEncodeEH000718	GM19193	TNFa	NFKB1	0.00531	1.32394	0.40484	0.02621	1.58	1.63
GSM2026812	HEK293	none	ZNF260	0.00522	1.26933	0.34407	0.02587	1.59	1.62
GSM717978	LY2	none	NCOA1	0.00572	1.34785	0.43066	0.02781	1.56	1.61
GSE91614	K562	none	PBX2	0.00564	1.27310	0.34835	0.02758	1.56	1.60
GSM856791	786-O	none	ARNT	0.00621	1.37351	0.45787	0.02969	1.53	1.59
wgEncodeEH001630	HepG2	none	FOXA1	0.00586	1.28327	0.35982	0.02834	1.55	1.59
wgEncodeEH001639	T-47D	DMSO 0.02pct	GATA3	0.00591	1.26734	0.34180	0.02837	1.55	1.58
wgEncodeEH001824	K562	none	TAL1	0.00588	1.26298	0.33683	0.02834	1.55	1.58
wgEncodeEH003082	H1-hESC	none	EZH2	0.00628	1.33807	0.42015	0.02990	1.52	1.58
wgEncodeEH002059	RPTEC	none	CTCF	0.00664	1.34829	0.43113	0.03105	1.51	1.57
GSM1462476	T47D	1%O <sub>2</sub> + 1mM DMOG 16h	ARNT	0.00664	1.34773	0.43053	0.03105	1.51	1.57
GSM2026787	HEK293	none	ZNF41	0.00644	1.27319	0.34844	0.03050	1.52	1.56
GSE92093	GM12878	none	TRIM22	0.00817	1.45166	0.53771	0.03529	1.45	1.55
GSM2095923	Kasumi	none	NR4A1	0.00679	1.28848	0.36567	0.03161	1.50	1.54
GSE53041.7	LX2	80 min calcitriol	VDR	0.00910	1.51829	0.60245	0.03805	1.42	1.54

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

000008745e2000018471

CSV

GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida



GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular



188

Accession	Cell	Treatment	Transcription factor	p	OR	log2.OR	adj.p. value	log10.adj. p.value	Distance
wgEncodeEH000985	HMF	none	CTCF	0.00718	1.32974	0.41114	0.03274	1.48	1.54
wgEncodeEH000572	GM19240	none	CTCF	0.00716	1.32489	0.40587	0.03274	1.48	1.54
GSM2574801	HepG2	none	NFATC3	0.00688	1.27521	0.35074	0.03186	1.50	1.54
GSM1208730	LoVo	none	E2F7	0.00721	1.31258	0.39240	0.03274	1.48	1.54
GSM1898102	SH-SY5Y	none	SATB1	0.01349	1.74730	0.80513	0.05044	1.30	1.53
wgEncodeEH002078	A549	none	CTCF	0.00767	1.34095	0.42326	0.03415	1.47	1.53
GSM1239665	MDA-MB-231	none	XBP1	0.03977	2.22875	1.15623	0.10083	1.00	1.53
wgEncodeEH002846	K562	none	BACH1	0.00783	1.34892	0.43180	0.03448	1.46	1.52
GSM856790	786-O	none	HIF2a	0.00959	1.50249	0.58735	0.03918	1.41	1.52
wgEncodeEH002822	A549	none	RAD21	0.00717	1.26465	0.33874	0.03274	1.48	1.52
GSM2095924	Kasumi	none	NR4A1	0.00770	1.31552	0.39564	0.03415	1.47	1.52
wgEncodeEH001895	HFF-Myc	none	CTCF	0.00769	1.30996	0.38952	0.03415	1.47	1.52
GSM1278507	primary epidermal keratinocytes	none	MAFB	0.00806	1.33905	0.42121	0.03508	1.45	1.51
wgEncodeEH000987	HPF	none	CTCF	0.00810	1.30988	0.38943	0.03512	1.45	1.51
GSE69566.2	HepG2	none	ARID1B	0.00763	1.25691	0.32989	0.03415	1.47	1.50
GSE53041.10	THP-1	none	VDR	0.01180	1.58807	0.66728	0.04578	1.34	1.50
wgEncodeEH002825	H1-hESC	none	CEBPB	0.00795	1.25679	0.32974	0.03473	1.46	1.50
wgEncodeEH002847	K562	none	RCOR1	0.00830	1.28869	0.36591	0.03554	1.45	1.49
wgEncodeEH000667	K562	IFNa 6h	JUN	0.00871	1.32214	0.40288	0.03685	1.43	1.49
GSM1024799	MCF-7	none	AHR	0.01022	1.42304	0.50898	0.04114	1.39	1.48
wgEncodeEH002305	HepG2	none	CEBPB	0.00850	1.25124	0.32336	0.03628	1.44	1.48
wgEncodeEH002840	MCF10A-Er-Src	4OHTAM 1µM 4h	MYC	0.00873	1.25126	0.32339	0.03685	1.43	1.47
wgEncodeEH001479	GM12878	none	BATF	0.00874	1.24903	0.32081	0.03685	1.43	1.47
wgEncodeEH002058	NHDF-neo	none	CTCF	0.00926	1.30405	0.38300	0.03830	1.42	1.47
wgEncodeEH000982	HCFaa	none	CTCF	0.00916	1.28942	0.36672	0.03816	1.42	1.47
GSE91518	K562	none	NR4A1	0.00920	1.25057	0.32259	0.03817	1.42	1.45
wgEncodeEH001210	K562	none	JUNB	0.00934	1.25843	0.33162	0.03847	1.41	1.45
wgEncodeEH000663	K562	IFNa 30	STAT1	0.01364	1.57779	0.65791	0.05075	1.29	1.45
GSE53041.5	LS180	80 min calcitriol	VDR	0.01009	1.33791	0.41999	0.04092	1.39	1.45
GSE96385	HepG2	none	HNF1A	0.00980	1.25434	0.32693	0.03992	1.40	1.44

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

000008745e2000018471

CSV

GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida



GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular

Accession	Cell	Treatment	Transcription factor	p	OR	log2.OR	adj.p.value	log10.adj.p.value	Distance
wgEncodeEH000666	K562	IFNa 6h	STAT2	0.01176	1.39329	0.47849	0.04578	1.34	1.42
wgEncodeEH001812	GM12878	none	USF2	0.01034	1.24996	0.32188	0.04149	1.38	1.42
GSM2574794	GM12878	none	TP73	0.01410	1.50953	0.59410	0.05161	1.29	1.42
wgEncodeEH000717	GM19099	TNFa	NFKB1	0.01057	1.26465	0.33874	0.04223	1.37	1.42
wgEncodeEH000683	K562	none	GATA2	0.01076	1.25901	0.33229	0.04286	1.37	1.41
wgEncodeEH002811	GM12878	none	IKZF1	0.01351	1.43810	0.52416	0.05044	1.30	1.40
wgEncodeEH000749	GM12878	none	RAD21	0.01127	1.25566	0.32845	0.04437	1.35	1.39
wgEncodeEH000552	HUVEC	none	POLR2A	0.01139	1.25760	0.33067	0.04468	1.35	1.39
wgEncodeEH001851	GM12878	none	CTCF	0.01216	1.32050	0.40108	0.04702	1.33	1.39
wgEncodeEH000639	GM12878	none	JUND	0.01351	1.39710	0.48244	0.05044	1.30	1.38
GSM2390642	HUVEC	Hypoxia	HIF2a	0.02314	1.70605	0.77066	0.07164	1.14	1.38
wgEncodeEH001544	HepG2	none	TCF12	0.01374	1.37790	0.46247	0.05082	1.29	1.37
GSM1065722	K562	30 min heatshock (42°C)	HSF2	0.01221	1.27504	0.35054	0.04704	1.33	1.37
wgEncodeEH000541	HeLa-S3	none	CTCF	0.01312	1.30789	0.38724	0.04958	1.30	1.36
GSM1239481	LoVo	none	NR4A1	0.02919	1.76542	0.82001	0.08236	1.08	1.36
wgEncodeEH002548	NHLF	none	CTCF	0.01276	1.26671	0.34108	0.04866	1.31	1.36
wgEncodeEH000720	HeLa-S3	none	SMARCC1	0.01272	1.25407	0.32661	0.04866	1.31	1.35
wgEncodeEH000619	K562	none	FOS	0.01304	1.25108	0.32317	0.04954	1.31	1.34
GSM2026867	HEK293	none	ZNF350	0.01315	1.23822	0.30827	0.04958	1.30	1.34
GSM1443814	hMADS-3	none	KLF11	0.01376	1.27015	0.34500	0.05082	1.29	1.34
wgEncodeEH000532	GM12878	none	CTCF	0.01443	1.29225	0.36989	0.05242	1.28	1.33
wgEncodeEH000988	HRPEpiC	none	CTCF	0.01463	1.29500	0.37296	0.05294	1.28	1.33
wgEncodeEH001460	PFSK-1	none	FOXP2	0.01393	1.24244	0.31317	0.05127	1.29	1.33
wgEncodeEH001785	PBDEFetal	none	GATA1	0.01740	1.42081	0.50672	0.05938	1.23	1.33
wgEncodeEH001770	SH-SY5Y	none	GATA2	0.01412	1.23476	0.30424	0.05161	1.29	1.32
wgEncodeEH001616	SK-N-SH_RA	none	EP300	0.01417	1.23256	0.30166	0.05164	1.29	1.32
wgEncodeEH001041	Osteobl	none	CTCF	0.01583	1.29339	0.37116	0.05560	1.25	1.31
wgEncodeEH001000	HSMMtube	none	CTCF	0.01601	1.28029	0.35647	0.05571	1.25	1.30
GSM1208594	LoVo	none	CAMTA2	0.01516	1.23704	0.30689	0.05450	1.26	1.30
wgEncodeEH001521	GM12891	none	SPI1	0.01541	1.25214	0.32440	0.05512	1.26	1.30
GSE105487	Liver	none	FOXA2	0.01543	1.22915	0.29766	0.05512	1.26	1.29

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

000008745e2000018471

CSV

GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida



GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular

190

Accession	Cell	Treatment	Transcription factor	p	OR	log2.OR	adj.p. value	log10.adj. p.value	Distance
wgEncodeEH001470	HepG2	none	JUND	0.01578	1.22950	0.29807	0.05560	1.25	1.29
wgEncodeEH003214	H1-hESC	none	TEAD4	0.01575	1.22820	0.29655	0.05560	1.25	1.29
wgEncodeEH000405	HRE	none	CTCF	0.01655	1.26801	0.34257	0.05721	1.24	1.29
wgEncodeEH000688	HeLa-S3	none	E2F1	0.01593	1.22796	0.29626	0.05571	1.25	1.29
GSE76376	HEE	none	HNF1A	0.02189	1.47550	0.56120	0.06957	1.16	1.29
wgEncodeEH001496	GM12878	none	SP1	0.01637	1.23613	0.30583	0.05676	1.25	1.28
wgEncodeEH001048	NHDF-Ad	none	CTCF	0.01715	1.27668	0.35240	0.05888	1.23	1.28
wgEncodeEH001556	T-47D	Genistein 100nM	ESR1	0.01785	1.27726	0.35305	0.06014	1.22	1.27
wgEncodeEH001577	T-47D	Estradiol 10nM	ESR1	0.01785	1.27726	0.35305	0.06014	1.22	1.27
GSE91997	HeLa-S3	none	NFE2L2	0.01720	1.23040	0.29913	0.05888	1.23	1.27
wgEncodeEH000986	HPAF	none	CTCF	0.01842	1.29363	0.37142	0.06167	1.21	1.27
GSM2026819	HEK293	none	ZNF322	0.01712	1.22676	0.29485	0.05888	1.23	1.26
wgEncodeEH001598	K562	none	E2F6	0.01782	1.25475	0.32740	0.06014	1.22	1.26
wgEncodeEH001572	ECC-1	DMSO 0.02pct	POLR2A	0.01783	1.25225	0.32452	0.06014	1.22	1.26
wgEncodeEH000638	K562	none	GATA1	0.01887	1.28934	0.36664	0.06260	1.20	1.26
wgEncodeEH001593	H1-hESC	none	RAD21	0.01934	1.30522	0.38429	0.06397	1.19	1.25
wgEncodeEH001482	K562	none	SPI1	0.01813	1.23018	0.29886	0.06090	1.22	1.25
GSM1462475	T47D	1%O <sub>2</sub> + 1mM DMOG 16h	HIF1a	0.02136	1.35733	0.44077	0.06854	1.16	1.24
wgEncodeEH000664	K562	IFNa 6h	STAT1	0.02314	1.37867	0.46328	0.07164	1.14	1.24
GSM1407634	HEK293	none	ZNF35	0.02046	1.29783	0.37611	0.06681	1.18	1.23
GSM1443812	hMADS-3	none	PPARG	0.02127	1.31790	0.39824	0.06854	1.16	1.23
wgEncodeEH001891	BE2_C	none	CTCF	0.02045	1.27273	0.34792	0.06681	1.18	1.23
wgEncodeEH000989	HA-sp	none	CTCF	0.02051	1.26890	0.34358	0.06681	1.18	1.22
wgEncodeEH002065	GM12878	none	NFYB	0.01965	1.22030	0.28724	0.06479	1.19	1.22
GSM1065714	K562	30 min heatshock (42°C)	HSF1	0.02085	1.26951	0.34427	0.06772	1.17	1.22
GSM1208805	LoVo	none	TP73	0.02037	1.23368	0.30297	0.06681	1.18	1.21
wgEncodeEH001570	K562	none	BCL3	0.02549	1.36892	0.45304	0.07591	1.12	1.21
GSE64233.2	SGBS	TNF	RELA	0.02131	1.22795	0.29625	0.06854	1.16	1.20
GSE96359	HepG2	none	BCL6	0.02169	1.23948	0.30974	0.06938	1.16	1.20
wgEncodeEH001833	GM12878	none	SMC3	0.02118	1.22116	0.28825	0.06854	1.16	1.20

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

000008745e2000018471

CSV

GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida



GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular

Accession	Cell	Treatment	Transcription factor	p	OR	log2.OR	adj.p. value	log10.adj. p.value	Distance
wgEncodeEH000570	GM19238	none	CTCF	0.02319	1.27407	0.34945	0.07164	1.14	1.20
wgEncodeEH002402	Dnd41	none	CTCF	0.02280	1.26836	0.34296	0.07145	1.15	1.20
wgEncodeEH000392	GM06990	none	CTCF	0.02286	1.26509	0.33924	0.07145	1.15	1.20
wgEncodeEH002067	HeLa-S3	none	NFYB	0.02192	1.22698	0.29512	0.06957	1.16	1.19
wgEncodeEH001819	HeLa-S3	none	USF2	0.02194	1.21656	0.28281	0.06957	1.16	1.19
wgEncodeEH000569	GM12891	none	CTCF	0.02374	1.25819	0.33135	0.07271	1.14	1.19
wgEncodeEH001561	HepG2	none	SP1	0.02251	1.22248	0.28981	0.07116	1.15	1.18
GSM1525104	Jurkat	KDM3A phosphorylation	KDM3A	0.02286	1.21652	0.28276	0.07145	1.15	1.18
GSM2026790	HEK293	none	ZNF140	0.02308	1.21594	0.28207	0.07164	1.14	1.18
wgEncodeEH001586	ECC-1	DMSO 0.02pct	FOXA1	0.02494	1.26574	0.33999	0.07511	1.12	1.17
wgEncodeEH000403	BJ	none	CTCF	0.02510	1.26172	0.33539	0.07517	1.12	1.17
wgEncodeEH001660	H1-hESC	none	FOSL1	0.03055	1.37025	0.45444	0.08399	1.08	1.17
wgEncodeEH000396	HEK293	none	CTCF	0.02526	1.24962	0.32149	0.07542	1.12	1.17
wgEncodeEH001894	HCM	none	CTCF	0.02620	1.27095	0.34591	0.07692	1.11	1.17
wgEncodeEH002831	IMR90	none	CTCF	0.02576	1.25845	0.33165	0.07622	1.12	1.17
GSM2026748	HEK293	none	PRDM1	0.02477	1.22873	0.29717	0.07500	1.12	1.16
GSM2758962	HUVEC	none	SIN3A	0.02468	1.22546	0.29332	0.07493	1.13	1.16
wgEncodeEH000439	SK-N-SH_RA	none	CTCF	0.02648	1.25981	0.33321	0.07692	1.11	1.16
wgEncodeEH002300	ECC-1	DMSO 0.02pct	CTCF	0.02457	1.21377	0.27949	0.07484	1.13	1.16
GSE92157	K562	none	NCOR1	0.02456	1.21231	0.27776	0.07484	1.13	1.16
GSM2026801	HEK293	none	ZNF33A	0.02497	1.21358	0.27927	0.07511	1.12	1.16
wgEncodeEH000560	H1-hESC	none	CTCF	0.02606	1.24291	0.31373	0.07675	1.11	1.16
wgEncodeEH001765	PBDE	none	GATA1	0.02501	1.21110	0.27632	0.07511	1.12	1.16
wgEncodeEH001613	SK-N-SH_RA	none	CTCF	0.02635	1.23854	0.30864	0.07692	1.11	1.16
wgEncodeEH002303	A549	EtOH 0.02pct	BCL3	0.02646	1.23441	0.30382	0.07692	1.11	1.15
wgEncodeEH000715	GM18505	TNFa	NFKB1	0.02581	1.22050	0.28747	0.07622	1.12	1.15
wgEncodeEH002291	A549	EtOH 0.02pct	USF1	0.02566	1.21997	0.28684	0.07619	1.12	1.15
wgEncodeEH002296	HepG2	none	ZBTB7A	0.02647	1.21250	0.27798	0.07692	1.11	1.15
wgEncodeEH002087	H1-hESC	none	RBBP5	0.02717	1.22581	0.29373	0.07851	1.11	1.14
wgEncodeEH001614	SK-N-SH_RA	none	RAD21	0.02830	1.25693	0.32990	0.08047	1.09	1.14
wgEncodeEH002382	K562	none	NR2F2	0.02689	1.20792	0.27252	0.07793	1.11	1.14

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

000008745e2000018471

CSV

GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida



GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular

192

Accession	Cell	Treatment	Transcription factor	p	OR	log2.OR	adj.p. value	log10.adj. p.value	Distance
GSE92078	K562	none	FOXA1	0.06124	1.67913	0.74771	0.13744	0.86	1.14
GSM957606	T-ALL	none	TCF3	0.02816	1.24849	0.32018	0.08041	1.09	1.14
GSE95962	liver	none	NR2F2	0.03018	1.28239	0.35884	0.08341	1.08	1.14
GSE37589	GM11992	none	NFE2L2	0.02763	1.20655	0.27089	0.07962	1.10	1.13
wgEncodeEH001495	GM12878	none	PAX5	0.02780	1.20853	0.27325	0.07989	1.10	1.13
wgEncodeEH000063	NHEK	none	CTCF	0.02934	1.25004	0.32197	0.08241	1.08	1.13
wgEncodeEH001602	T-47D	DMSO 0.02pct	EP300	0.02820	1.21274	0.27827	0.08041	1.09	1.13
wgEncodeEH000085	H1-hESC	none	CTCF	0.03121	1.27577	0.35137	0.08473	1.07	1.13
wgEncodeEH000061	HUVEC	none	POLR2A	0.02890	1.22788	0.29618	0.08177	1.09	1.13
wgEncodeEH000419	HMEC	none	CTCF	0.03099	1.26469	0.33878	0.08439	1.07	1.13
wgEncodeEH000447	GM12864	none	CTCF	0.03101	1.25012	0.32206	0.08439	1.07	1.12
GSM1831600	SMMC-7721	Transfection by PBX3 Lentivirus	PBX3	0.02997	1.22526	0.29309	0.08326	1.08	1.12
wgEncodeEH002072	MCF-7	none	TCF7L2	0.02995	1.22519	0.29300	0.08326	1.08	1.12
wgEncodeEH002848	K562	none	TBL1XR1	0.03010	1.21782	0.28430	0.08339	1.08	1.12
wgEncodeEH001127	Fibroblasts	none	JUND	0.03182	1.25120	0.32331	0.08593	1.07	1.11
wgEncodeEH001648	GM12878	none	MEF2C	0.03036	1.21406	0.27984	0.08368	1.08	1.11
GSM2026818	HEK293	none	ZNF449	0.02992	1.20610	0.27034	0.08326	1.08	1.11
GSM2026847	HEK293	none	ZSCAN31	0.03073	1.20527	0.26935	0.08407	1.08	1.11
wgEncodeEH001835	H1-hESC	none	RFX5	0.03646	1.34236	0.42478	0.09467	1.02	1.11
wgEncodeEH001789	HeLa-S3	none	RAD21	0.03149	1.22280	0.29019	0.08526	1.07	1.11
wgEncodeEH000571	GM19239	none	CTCF	0.03250	1.24053	0.31096	0.08714	1.06	1.10
wgEncodeEH001844	K562	none	MAFK	0.03208	1.20529	0.26938	0.08621	1.06	1.10
GSM1208761	LoVo	none	ISL1	0.04061	1.38817	0.47318	0.10247	0.99	1.10
GSM1407627	HEK293	none	ZNF250	0.03723	1.32008	0.40063	0.09598	1.02	1.09
wgEncodeEH001608	HepG2	none	RAD21	0.03397	1.24760	0.31915	0.09039	1.04	1.09
wgEncodeEH000449	GM12872	none	CTCF	0.03527	1.24634	0.31770	0.09240	1.03	1.08
wgEncodeEH001836	H1-hESC	none	RAD21	0.03487	1.23922	0.30943	0.09188	1.04	1.08
wgEncodeEH003434	MCF-7	Serum stimulated media	CTCF	0.03599	1.25791	0.33103	0.09368	1.03	1.08
wgEncodeEH000624	K562	none	NFE2	0.03812	1.29976	0.37825	0.09756	1.01	1.08
GSE91411	HEK293	none	ZNF2	0.03434	1.21350	0.27917	0.09092	1.04	1.08

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

000008745e2000018471

CSV

GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida



GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular

Accession	Cell	Treatment	Transcription factor	p	OR	log2.OR	adj.p.value	log10.adj.p.value	Distance
wgEncodeEH000701	K562	none	NELFE	0.05532	1.51359	0.59798	0.12761	0.89	1.08
wgEncodeEH002810	IMR90	none	RAD21	0.03533	1.21666	0.28293	0.09240	1.03	1.07
wgEncodeEH001021	HeLa-S3	none	POLR2A	0.03705	1.25274	0.32509	0.09574	1.02	1.07
GSE91809	HepG2	none	NFE2L2	0.03533	1.19747	0.25999	0.09240	1.03	1.07
wgEncodeEH002416	HepG2	none	EZH2	0.04148	1.31976	0.40028	0.10323	0.99	1.06
wgEncodeEH001477	GM12878	none	PBX3	0.03585	1.20047	0.26360	0.09355	1.03	1.06
wgEncodeEH002055	HCT-116	none	CTCF	0.03782	1.23403	0.30338	0.09703	1.01	1.06
wgEncodeEH000559	NHEK	none	CTCF	0.03864	1.25113	0.32323	0.09843	1.01	1.06
wgEncodeEH001594	HepG2	none	FOXA1	0.03733	1.21188	0.27725	0.09601	1.02	1.05
GSM2257669	U2OS	none	ARNTL	0.03687	1.19816	0.26082	0.09550	1.02	1.05
wgEncodeEH001803	HepG2	none	RAD21	0.03827	1.21569	0.28178	0.09773	1.01	1.05
wgEncodeEH000694	K562	none	POLR3G	0.15399	1.84062	0.88019	0.27255	0.56	1.05
wgEncodeEH000739	GM18951	none	POLR2A	0.03912	1.21024	0.27529	0.09941	1.00	1.04
wgEncodeEH000979	AG10803	none	CTCF	0.04227	1.23264	0.30176	0.10360	0.98	1.03
wgEncodeEH001893	HAc	none	CTCF	0.04226	1.22987	0.29851	0.10360	0.98	1.03
wgEncodeEH000054	HUVEC	none	CTCF	0.04140	1.21945	0.28623	0.10323	0.99	1.03
wgEncodeEH002817	A549	none	BHLHE40	0.04286	1.23455	0.30399	0.10472	0.98	1.03
GSM2026861	HEK293	none	ZBTB18	0.04106	1.19752	0.26005	0.10323	0.99	1.02
wgEncodeEH000652	NT2-D1	none	SUZ12	0.04612	1.28116	0.35745	0.11091	0.96	1.02
GSE95936	HepG2	none	MLX	0.04128	1.19131	0.25255	0.10323	0.99	1.02
wgEncodeEH002032	HepG2	none	BHLHE40	0.04215	1.19081	0.25195	0.10360	0.98	1.02
wgEncodeEH001516	HepG2	none	CTCF	0.04448	1.23796	0.30797	0.10794	0.97	1.01
wgEncodeEH002318	HepG2	none	MBD4	0.04413	1.21747	0.28389	0.10733	0.97	1.01
GSM1239545	LoVo	none	ZNF281	0.04340	1.19801	0.26064	0.10580	0.98	1.01
GSM955978	HUVEC	24h 1% O <sub>2</sub>	HIF1a	0.05875	1.41065	0.49636	0.13296	0.88	1.01
wgEncodeEH000690	GM12878	TNFa	NFKB1	0.04467	1.18792	0.24843	0.10814	0.97	1.00
wgEncodeEH001837	H1-hESC	none	USF2	0.04521	1.19661	0.25896	0.10923	0.96	1.00
GSM1526876	HMEC-TERT	none	E2F1	0.04686	1.21028	0.27534	0.11220	0.95	0.99
GSM1438987	ICN12	none	TCF3	0.04576	1.18647	0.24667	0.11029	0.96	0.99
GSM2466489	HEK293T	none	ZNF189	0.04854	1.22502	0.29281	0.11453	0.94	0.99
wgEncodeEH002834	K562	none	EP300	0.04667	1.18751	0.24794	0.11200	0.95	0.98
GSM1208743	LoVo	none	ZFH3	0.04736	1.19687	0.25927	0.11288	0.95	0.98

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

000008745e2000018471

CSV

GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>



GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular

194

Accession	Cell	Treatment	Transcription factor	p	OR	log2.OR	adj.p. value	log10.adj. p.value	Distance
GSM1208606	LoVo	none	E2F2	0.04782	1.20498	0.26901	0.11362	0.94	0.98
GSM2026788	HEK293	none	ZNF41	0.04858	1.20833	0.27302	0.11453	0.94	0.98
GSM1208677	LoVo	none	SMAD4	0.05190	1.25728	0.33030	0.12120	0.92	0.97
wgEncodeEH002804	K562	none	MAFF	0.04832	1.18578	0.24584	0.11441	0.94	0.97
wgEncodeEH000080	HepG2	none	CTCF	0.05004	1.21832	0.28489	0.11772	0.93	0.97
GSM2480810	LNCaP	none	SMARCA4	0.05151	1.24327	0.31414	0.12063	0.92	0.97
wgEncodeEH001494	A549	DEX 100nM	POLR2A	0.05144	1.21489	0.28082	0.12063	0.92	0.96
wgEncodeEH000551	HUVEC	none	CTCF	0.05198	1.20779	0.27237	0.12120	0.92	0.96
wgEncodeEH001674	U87	none	POLR2A	0.05368	1.19049	0.25156	0.12437	0.91	0.94
wgEncodeEH001487	GM12878	none	EP300	0.05516	1.22053	0.28750	0.12753	0.89	0.94
wgEncodeEH001787	GM12878	none	WRNIP1	0.05997	1.28029	0.35647	0.13543	0.87	0.94
GSM2026805	HEK293	none	ZNF146	0.05330	1.17996	0.23874	0.12376	0.91	0.94
GSE91830	A549	none	SIN3A	0.05828	1.24932	0.32114	0.13218	0.88	0.94
wgEncodeEH001890	A549	none	CTCF	0.05618	1.21109	0.27631	0.12929	0.89	0.93
GSM1239581	LoVo	none	MEOX2	0.09027	1.48378	0.56927	0.18438	0.73	0.93
GSE53041.6	LS180	none	VDR	0.17934	1.70850	0.77273	0.30666	0.51	0.93
wgEncodeEH001902	WI-38	none	CTCF	0.05655	1.19315	0.25477	0.12962	0.89	0.92
GSE69566.3	HepG2	none	ARID2	0.05791	1.19757	0.26011	0.13188	0.88	0.92
GSM2026865	HEK293	none	ZNF436	0.05827	1.17898	0.23754	0.13218	0.88	0.91
wgEncodeEH002313	ECC-1	BPA 100nM	ESR1	0.12339	1.56443	0.64564	0.23394	0.63	0.90
wgEncodeEH001780	HepG2	none	TCF7L2	0.06591	1.26598	0.34026	0.14700	0.83	0.90
GSM1208802	LoVo	none	TEAD2	0.06051	1.18273	0.24212	0.13638	0.87	0.90
GSM1208751	LoVo	none	GLI3	0.06088	1.18456	0.24435	0.13692	0.86	0.90
wgEncodeEH001649	H1-hESC	none	CTCF	0.06263	1.21078	0.27593	0.14022	0.85	0.90
wgEncodeEH001605	K562	none	MAX	0.06766	1.21568	0.28176	0.15028	0.82	0.87
GSM1208738	LoVo	none	ETS2	0.06837	1.21533	0.28135	0.15123	0.82	0.87
wgEncodeEH000450	GM12873	none	CTCF	0.06837	1.21533	0.28135	0.15123	0.82	0.87
wgEncodeEH000729	GM12892	none	POLR2A	0.06745	1.18450	0.24428	0.15012	0.82	0.86
wgEncodeEH001131	MCF-7	estrogen	CTCF	0.07194	1.21874	0.28539	0.15561	0.81	0.86
GSM1208735	LoVo	none	ERG	0.07038	1.20535	0.26945	0.15378	0.81	0.86
wgEncodeEH001806	NB4	none	MAX	0.06957	1.19188	0.25324	0.15251	0.82	0.86
wgEncodeEH002828	H1-hESC	none	MAFK	0.06966	1.19092	0.25208	0.15251	0.82	0.85

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

000008745e2000018471

CSV

GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>



GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular



Accession	Cell	Treatment	Transcription factor	p	OR	log2.OR	adj.p.value	log10.adj.p.value	Distance
wgEncodeEH000397	HL-60	none	CTCF	0.06878	1.16821	0.22430	0.15183	0.82	0.85
GSM1366692	keratinocytes	none	TP63	0.06911	1.16767	0.22363	0.15197	0.82	0.85
wgEncodeEH000073	NHEK	none	POLR2A	0.07170	1.19150	0.25278	0.15541	0.81	0.85
wgEncodeEH002086	K562	none	EP300	0.12895	1.49205	0.57730	0.24108	0.62	0.85
wgEncodeEH001135	Glioblasts	none	CTCF	0.07467	1.22101	0.28808	0.16093	0.79	0.84
wgEncodeEH001208	K562	none	GATA2	0.07095	1.17730	0.23549	0.15471	0.81	0.84
wgEncodeEH002809	IMR90	none	POLR2A	0.07127	1.17185	0.22879	0.15510	0.81	0.84
wgEncodeEH002328	GM12878	none	EGR1	0.07147	1.17129	0.22809	0.15520	0.81	0.84
GSM1526874	HMEC-TERT	none	FOXM1	0.07838	1.24905	0.32084	0.16719	0.78	0.84
wgEncodeEH001575	ECC-1	Genistein 100nM	ESR1	0.07470	1.18495	0.24482	0.16093	0.79	0.83
wgEncodeEH001508	A549	EtOH 0.02pct	CTCF	0.07597	1.18582	0.24588	0.16268	0.79	0.83
wgEncodeEH000761	K562	IFNg 6h	STAT1	0.08126	1.23671	0.30651	0.17096	0.77	0.83
GSM1239583	LoVo	none	MYNN	0.15948	1.52956	0.61311	0.27967	0.55	0.83
GSM1239508	LoVo	none	ID3	0.08580	1.26414	0.33816	0.17671	0.75	0.83
GSM1961563	TH1	none	AFF4	0.07558	1.16317	0.21806	0.16238	0.79	0.82
wgEncodeEH000781	HeLa-S3	none	SMARCA4	0.09039	1.28486	0.36161	0.18438	0.73	0.82
GSM2574753	K562	none	FOXO3	0.08492	1.23695	0.30679	0.17522	0.76	0.82
wgEncodeEH001640	GM12878	none	RAD21	0.07804	1.18141	0.24051	0.16679	0.78	0.81
GSE91805	K562	none	ESRRA	0.08790	1.24831	0.31997	0.18032	0.74	0.81
wgEncodeEH002805	K562	IFNa 30	JUN	0.07883	1.17544	0.23320	0.16781	0.78	0.81
wgEncodeEH000448	GM12865	none	CTCF	0.08182	1.19443	0.25633	0.17178	0.77	0.81
wgEncodeEH002288	A549	EtOH 0.02pct	ATF3	0.08205	1.19226	0.25370	0.17185	0.76	0.81
GSM2574781	HepG2	none	ARID3A	0.08083	1.17991	0.23867	0.17038	0.77	0.80
wgEncodeEH000410	HUVEC	none	CTCF	0.08290	1.18535	0.24532	0.17185	0.76	0.80
wgEncodeEH001621	SK-N-SH_RA	none	USF1	0.07983	1.16718	0.22303	0.16925	0.77	0.80
wgEncodeEH000398	HeLa-S3	none	CTCF	0.08262	1.18029	0.23914	0.17185	0.76	0.80
wgEncodeEH001845	K562	none	SMC3	0.08025	1.16379	0.21883	0.16956	0.77	0.80
GSM1867061	SK-N-BE(2)-C	none	MYCN	0.08269	1.16841	0.22454	0.17185	0.76	0.80
wgEncodeEH002071	PANC-1	none	TCF7L2	0.08297	1.16335	0.21828	0.17185	0.76	0.80
wgEncodeEH002850	K562	none	UBTF	0.08268	1.16235	0.21704	0.17185	0.76	0.80
GSM2758963	HUVEC	hypoxia	SIN3A	0.08491	1.17667	0.23471	0.17522	0.76	0.79
wgEncodeEH000679	K562	none	BRF1	0.25715	1.59288	0.67164	0.39832	0.40	0.78

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

000008745e2000018471

CSV

GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida



GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular

196

Accession	Cell	Treatment	Transcription factor	p	OR	log2.OR	adj.p. value	log10.adj. p.value	Distance
GSE91919	K562	none	HINFP	0.09470	1.22346	0.29097	0.19100	0.72	0.78
GSM1208704	LoVo	none	ZNF250	0.08927	1.16390	0.21896	0.18278	0.74	0.77
wgEncodeEH001865	K562	IFNa 30	IRF1	0.13312	1.38112	0.46584	0.24507	0.61	0.77
GSM1239489	LoVo	none	ARNTL	0.09076	1.17098	0.22772	0.18479	0.73	0.77
wgEncodeEH002057	MCF-7	none	CTCF	0.09341	1.19226	0.25370	0.18947	0.72	0.77
wgEncodeEH002330	GM12878	none	RUNX3	0.09438	1.19717	0.25962	0.19071	0.72	0.77
GSM1239442	LoVo	none	NR2F6	0.22731	1.53592	0.61910	0.36636	0.44	0.76
wgEncodeEH002347	K562	none	STAT5A	0.09361	1.16461	0.21985	0.18950	0.72	0.76
wgEncodeEH002066	HeLa-S3	none	NFYA	0.09330	1.16376	0.21879	0.18947	0.72	0.75
wgEncodeEH001585	K562	none	RAD21	0.09683	1.16959	0.22601	0.19420	0.71	0.75
GSE91936	K562	none	TEAD2	0.12969	1.33302	0.41470	0.24163	0.62	0.74
GSE60006	SW1353	none	HES1	0.15415	1.39754	0.48289	0.27255	0.56	0.74
wgEncodeEH002422	NHLF	none	EZH2	0.10011	1.17793	0.23626	0.19929	0.70	0.74
GSM1239589	LoVo	none	FOXO4	0.11819	1.27997	0.35611	0.22693	0.64	0.74
wgEncodeEH001656	T-47D	DMSO 0.02pct	CTCF	0.09887	1.15739	0.21087	0.19756	0.70	0.74
wgEncodeEH000712	GM12892	TNFa	NFKB1	0.09936	1.15902	0.21291	0.19816	0.70	0.73
wgEncodeEH000665	K562	IFNa 30	STAT2	0.10584	1.20500	0.26903	0.20914	0.68	0.73
GSM1208754	LoVo	none	HIVEP1	0.10527	1.15365	0.20620	0.20879	0.68	0.71
wgEncodeEH000738	GM18951	TNFa	NFKB1	0.10575	1.14698	0.19784	0.20914	0.68	0.71
GSM1537612	h9 hESC	none	NANOG	0.10665	1.14663	0.19740	0.20997	0.68	0.71
wgEncodeEH002813	HeLa-S3	none	TCF7L2	0.10798	1.14743	0.19841	0.21222	0.67	0.70
wgEncodeEH000543	HepG2	none	CTCF	0.11075	1.16529	0.22069	0.21607	0.67	0.70
wgEncodeEH000075	HMEC	none	CTCF	0.11032	1.16231	0.21699	0.21563	0.67	0.70
wgEncodeEH001527	H1-hESC	none	BCL11A	0.12464	1.24111	0.31163	0.23590	0.63	0.70
wgEncodeEH001857	K562	none	BHLHE40	0.11025	1.15280	0.20515	0.21563	0.67	0.70
GSM1306364	MGG8	none	SALL2	0.13314	1.25513	0.32784	0.24507	0.61	0.69
wgEncodeEH001646	K562	none	EGR1	0.11422	1.17088	0.22759	0.22244	0.65	0.69
wgEncodeEH002425	NH-A	none	EZH2	0.11502	1.16725	0.22312	0.22320	0.65	0.69
GSM1239529	LoVo	none	TCF7L1	0.13178	1.23187	0.30085	0.24458	0.61	0.68
wgEncodeEH002830	HeLa-S3	none	MAX	0.11822	1.16128	0.21571	0.22693	0.64	0.68
wgEncodeEH000735	GM12891	TNFa	NFKB1	0.11746	1.15220	0.20439	0.22693	0.64	0.68
GSE91406	K562	none	ZEB2	0.13184	1.21835	0.28493	0.24458	0.61	0.67

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

000008745e2000018471

CSV

GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida



GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular

Accession	Cell	Treatment	Transcription factor	p	OR	log2.OR	adj.p.value	log10.adj.p.value	Distance
wgEncodeEH001622	K562	none	HDAC2	0.11974	1.16099	0.21536	0.22944	0.64	0.67
GSM2026883	HEK293	none	ZNF224	0.12177	1.16956	0.22597	0.23175	0.63	0.67
wgEncodeEH002329	GM12878	none	MTA3	0.11701	1.14605	0.19667	0.22665	0.64	0.67
wgEncodeEH001507	A549	DEX 100nM	CTCF	0.12048	1.15997	0.21409	0.23046	0.64	0.67
GSE96365	HepG2	none	DRAP1	0.12160	1.15223	0.20442	0.23175	0.63	0.67
wgEncodeEH001468	GM12878	none	USF1	0.12231	1.14438	0.19457	0.23231	0.63	0.66
wgEncodeEH000451	GM12874	none	CTCF	0.12533	1.16226	0.21693	0.23637	0.63	0.66
wgEncodeEH001012	HeLa-S3	none	CTCF	0.12940	1.17243	0.22951	0.24149	0.62	0.66
wgEncodeEH001807	NB4	none	MYC	0.12507	1.15048	0.20224	0.23630	0.63	0.66
wgEncodeEH000699	HeLa-S3	none	E2F1	0.12791	1.16045	0.21469	0.23994	0.62	0.66
wgEncodeEH002068	K562	none	ZNF274	0.15452	1.25901	0.33229	0.27275	0.56	0.65
GSE43111	EP156T	none	TP63	0.13384	1.17273	0.22987	0.24544	0.61	0.65
GSE91940	GM12878	none	TRIM22	0.13309	1.17092	0.22764	0.24507	0.61	0.65
wgEncodeEH000404	Caco-2	none	CTCF	0.13196	1.16815	0.22422	0.24458	0.61	0.65
wgEncodeEH000649	K562	none	RAD21	0.12660	1.13940	0.18827	0.23834	0.62	0.65
wgEncodeEH002307	GM12878	none	NFATC1	0.12812	1.14452	0.19474	0.23994	0.62	0.65
GSE98983.1	HepG2	none	RELA	0.15532	1.25088	0.32294	0.27372	0.56	0.65
wgEncodeEH000394	GM12878	none	CTCF	0.13339	1.16039	0.21461	0.24513	0.61	0.65
wgEncodeEH002869	K562	none	MAX	0.13550	1.15858	0.21236	0.24773	0.61	0.64
wgEncodeEH000768	HUVEC	none	MAX	0.13283	1.13689	0.18509	0.24507	0.61	0.64
wgEncodeEH002297	HUVEC	none	POLR2A	0.13754	1.14409	0.19420	0.25017	0.60	0.63
wgEncodeEH000393	GM12801	none	CTCF	0.14668	1.18097	0.23997	0.26279	0.58	0.63
wgEncodeEH001493	A549	EtOH 0.02pct	POLR2A	0.14183	1.15692	0.21028	0.25625	0.59	0.63
wgEncodeEH001771	MCF10A-Er-Src	EtOH 0.01pct	POLR2A	0.14079	1.14480	0.19510	0.25479	0.59	0.63
wgEncodeEH001509	A549	DEX 100nM	USF1	0.14031	1.13796	0.18645	0.25436	0.59	0.62
wgEncodeEH001136	Glioblasts	none	POLR2A	0.14349	1.14459	0.19482	0.25794	0.59	0.62
GSM1208671	LoVo	none	RFX2	0.14308	1.13993	0.18895	0.25764	0.59	0.62
wgEncodeEH001588	T-47D	DMSO 0.02pct	FOXA1	0.14406	1.13731	0.18562	0.25854	0.59	0.62
wgEncodeEH001898	NB4	none	CTCF	0.14692	1.14644	0.19717	0.26279	0.58	0.61
wgEncodeEH002797	K562	none	CTCF	0.15205	1.16627	0.22191	0.27062	0.57	0.61
GSM1239560	LoVo	none	DDIT3	0.23731	1.34183	0.42420	0.37321	0.43	0.60
GSE91687	MCF-7	none	MTA1	0.15055	1.13211	0.17901	0.26839	0.57	0.60

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

000008745e2000018471

CSV

GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>



GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular

198

Accession	Cell	Treatment	Transcription factor	p	OR	log2.OR	adj.p.value	log10.adj.p.value	Distance
GSM1208713	LoVo	none	ATF5	0.15054	1.12989	0.17618	0.26839	0.57	0.60
wgEncodeEH001499	H1-hESC	none	POLR2A	0.15393	1.14009	0.18915	0.27255	0.56	0.60
wgEncodeEH000406	NHEK	none	CTCF	0.15796	1.15238	0.20462	0.27792	0.56	0.59
GSM2410317	SK-N-SH	none	EBF3	0.15974	1.15606	0.20922	0.27967	0.55	0.59
GSM1407651	HEK293	none	ZNF45	0.17618	1.18801	0.24854	0.30264	0.52	0.58
GSM1526875	HMEC-TERT	none	MYBL2	0.16654	1.14628	0.19696	0.29016	0.54	0.57
wgEncodeEH001867	K562	IFNg 30	MYC	0.16815	1.14036	0.18949	0.29202	0.53	0.57
GSM1208674	LoVo	none	SMAD2	0.16951	1.14641	0.19713	0.29391	0.53	0.57
GSM1589798	CXCR5hi CD4 T cells	none	BCL6	0.21589	1.26829	0.34289	0.35342	0.45	0.57
wgEncodeEH002800	K562	none	MYC	0.16703	1.13499	0.18269	0.29054	0.54	0.57
GSM1537615	NT2-D1	none	NANOG	0.16582	1.12981	0.17607	0.28938	0.54	0.57
GSM1312994	Caki-2	100 M desferoxamine	HIF1a	0.18620	1.19506	0.25709	0.31738	0.50	0.56
wgEncodeEH001864	K562	none	CCNT2	0.17635	1.13117	0.17782	0.30264	0.52	0.55
wgEncodeEH002844	HeLa-S3	none	RCOR1	0.17547	1.12384	0.16844	0.30264	0.52	0.55
wgEncodeEH001583	K562	none	USF1	0.17627	1.12176	0.16577	0.30264	0.52	0.54
wgEncodeEH000542	HeLa-S3	none	MYC	0.18868	1.16630	0.22194	0.32042	0.49	0.54
wgEncodeEH000716	GM18526	TNFa	NFKB1	0.18941	1.16228	0.21695	0.32117	0.49	0.54
wgEncodeEH002279	K562	none	CTCF	0.19060	1.14235	0.19201	0.32166	0.49	0.53
wgEncodeEH002438	NHDF-Ad	none	EZH2	0.19098	1.14041	0.18955	0.32179	0.49	0.53
GSM970261	ProEs	none	IRF2	0.19128	1.13165	0.17842	0.32179	0.49	0.52
GSM2466569	HEK293T	none	ZNF480	0.29282	1.30221	0.38097	0.44025	0.36	0.52
wgEncodeEH002306	GM12878	none	ATF2	0.18985	1.12146	0.16537	0.32124	0.49	0.52
GSM2410318	SK-N-SH	none	EBF3	0.19005	1.11938	0.16270	0.32124	0.49	0.52
wgEncodeEH001862	HepG2	none	EP300	0.23747	1.21787	0.28436	0.37321	0.43	0.51
wgEncodeEH000600	ProgFib	none	CTCF	0.19992	1.13847	0.18710	0.33424	0.48	0.51
GSM1239482	LoVo	none	PPARA	0.24835	1.23230	0.30135	0.38693	0.41	0.51
GSM1122317	ME-1	none	EP300	0.19509	1.11736	0.16010	0.32770	0.48	0.51
wgEncodeEH003212	GM12878	none	CEBPB	0.20192	1.13719	0.18547	0.33706	0.47	0.51
GSM1859070	Th2	none	MYB	0.19918	1.12201	0.16608	0.33352	0.48	0.50
wgEncodeEH000535	K562	none	CTCF	0.20774	1.14556	0.19605	0.34305	0.46	0.50

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

000008745e2000018471

CSV

GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida



GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular

Accession	Cell	Treatment	Transcription factor	p	OR	log2.OR	adj.p. value	log10.adj. p.value	Distance
wgEncodeEH001539	A549	EtOH 0.02pct	USF1	0.19890	1.11576	0.15803	0.33352	0.48	0.50
GSE53041.1	GM10855	80 min calcitriol	VDR	0.20816	1.13311	0.18028	0.34322	0.46	0.50
GSM1462461	CXCR5hi CD4 T cells	none	BCL6	0.20644	1.12120	0.16504	0.34195	0.47	0.49
wgEncodeEH001818	HeLa-S3	none	RFX5	0.20499	1.11344	0.15503	0.34006	0.47	0.49
GSM2466476	HEK293T	none	ZNF133	0.23886	1.17817	0.23655	0.37486	0.43	0.49
wgEncodeEH000758	HepG2	forskolin	POLR2A	0.21168	1.12204	0.16613	0.34847	0.46	0.49
wgEncodeEH002862	K562	none	MAZ	0.21484	1.13171	0.17850	0.35260	0.45	0.49
wgEncodeEH002069	HeLa-S3	none	TCF7L2	0.22647	1.15720	0.21064	0.36554	0.44	0.49
wgEncodeEH001768	MCF10A-Er-Src	4OHTAM 1µM 36h	POLR2A	0.21377	1.12274	0.16703	0.35138	0.45	0.48
wgEncodeEH002035	MCF-7	none	GATA3	0.24815	1.19068	0.25179	0.38693	0.41	0.48
GSM1208605	LoVo	none	DBP	0.21733	1.11385	0.15556	0.35452	0.45	0.48
wgEncodeEH000029	GM12878	none	CTCF	0.22453	1.13330	0.18054	0.36297	0.44	0.48
wgEncodeEH000452	GM12875	none	CTCF	0.22365	1.12916	0.17525	0.36208	0.44	0.47
GSE91630	MCF-7	none	SIX4	0.34979	1.28944	0.36675	0.50337	0.30	0.47
wgEncodeEH000702	HUVEC	none	POLR2A	0.21976	1.11238	0.15365	0.35746	0.45	0.47
GSE91643	K562	none	NCOR1	0.22782	1.13378	0.18114	0.36662	0.44	0.47
GSM955977	HUVEC	none	HIF1a	0.46514	1.33906	0.42122	0.61277	0.21	0.47
GSM2480808	LNCaP	none	SMARCA4	0.26688	1.19690	0.25930	0.41162	0.39	0.46
GSM1290023	T3M-1 Cl-10	none	ELF4	0.22896	1.11631	0.15874	0.36715	0.44	0.46
wgEncodeEH002835	MCF10A-Er-Src	4OHTAM 1µM 36h	E2F4	0.22868	1.11267	0.15402	0.36715	0.44	0.46
wgEncodeEH002024	K562	none	NFYB	0.22917	1.11184	0.15295	0.36715	0.44	0.46
GSE95940	HepG2	none	PPARG	0.23181	1.11243	0.15371	0.37028	0.43	0.46
GSM1208791	LoVo	none	RORA	0.23663	1.11948	0.16283	0.37321	0.43	0.46
wgEncodeEH001839	HeLa-S3	none	SMC3	0.23727	1.11941	0.16273	0.37321	0.43	0.46
wgEncodeEH001538	H1-hESC	none	EGR1	0.23082	1.10868	0.14884	0.36924	0.43	0.46
GSM1208590	LoVo	none	ARNT	0.23596	1.11175	0.15283	0.37321	0.43	0.45
wgEncodeEH002865	K562	none	ATF1	0.23389	1.10729	0.14704	0.37194	0.43	0.45
wgEncodeEH002089	K562	none	EZH2	0.43358	1.30384	0.38276	0.58473	0.23	0.45
GSE92196	K562	none	RFX1	0.24137	1.10682	0.14642	0.37824	0.42	0.45
wgEncodeEH000724	K562	none	SMARCA4	0.26931	1.15485	0.20771	0.41299	0.38	0.44

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

000008745e2000018471

CSV

GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida



GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular

200

Accession	Cell	Treatment	Transcription factor	p	OR	log2.OR	adj.p. value	log10.adj. p.value	Distance
GSM1024800	MCF-7	none	ARNT	0.31263	1.20990	0.27489	0.46356	0.33	0.43
wgEncodeEH001793	HepG2	none	TBP	0.25215	1.10509	0.14416	0.39118	0.41	0.43
GSM1239595	LoVo	none	MYBL1	0.27493	1.15538	0.20837	0.41914	0.38	0.43
GSM2466621	HEK293T	none	ZNF641	0.45908	1.29246	0.37012	0.60852	0.22	0.43
GSM1208616	LoVo	none	ETV4	0.25901	1.10802	0.14798	0.40062	0.40	0.42
wgEncodeEH000741	GM19099	none	POLR2A	0.26385	1.11057	0.15130	0.40752	0.39	0.42
wgEncodeEH000984	HEEpiC	none	CTCF	0.26809	1.11828	0.16129	0.41230	0.38	0.42
wgEncodeEH002863	K562	none	UBTF	0.26773	1.11569	0.15793	0.41230	0.38	0.42
wgEncodeEH002342	A549	EtOH 0.02pct	SIN3A	0.27328	1.10983	0.15034	0.41730	0.38	0.41
wgEncodeEH000596	H1-hESC	none	MYC	0.32498	1.18910	0.24987	0.47595	0.32	0.41
wgEncodeEH002271	SK-N-SH	none	SIN3A	0.27023	1.10091	0.13870	0.41381	0.38	0.41
GSM2466599	HEK293T	none	ZNF565	0.35344	1.21216	0.27758	0.50659	0.30	0.41
wgEncodeEH003093	K562	none	HDAC6	0.33130	1.18801	0.24855	0.48128	0.32	0.40
wgEncodeEH001860	HepG2	none	POLR2A	0.28253	1.12210	0.16620	0.42959	0.37	0.40
wgEncodeEH002022	HEK293	none	TCF7L2	0.28324	1.11203	0.15320	0.43007	0.37	0.40
wgEncodeEH000437	SAEC	none	CTCF	0.29095	1.11318	0.15469	0.43868	0.36	0.39
GSM1239506	LoVo	none	ID1	0.29406	1.11402	0.15578	0.44089	0.36	0.39
wgEncodeEH001484	GM12878	none	IRF4	0.28790	1.09765	0.13442	0.43591	0.36	0.38
wgEncodeEH001805	K562	none	POLR2A	0.31845	1.14600	0.19660	0.46896	0.33	0.38
wgEncodeEH000708	GM12878	none	POLR2A	0.29200	1.09960	0.13697	0.43963	0.36	0.38
GSM558470	HeLa	none	PHF8	0.29541	1.09842	0.13543	0.44229	0.35	0.38
GSM1208693	LoVo	none	TFE3	0.30203	1.10827	0.14831	0.45033	0.35	0.38
GSM2480802	LNCaP	none	AR	0.29930	1.09784	0.13467	0.44750	0.35	0.37
wgEncodeEH000676	K562	none	E2F6	0.30131	1.09563	0.13177	0.44988	0.35	0.37
GSM991660	IMR90	none	E2F7	0.30669	1.10119	0.13907	0.45663	0.34	0.37
wgEncodeEH002293	A549	DEX 100nM	FOXA1	0.42270	1.21078	0.27594	0.57229	0.24	0.37
wgEncodeEH000734	GM10847	TNFa	NFKB1	0.30785	1.09437	0.13010	0.45710	0.34	0.36
wgEncodeEH001652	K562	none	CTCF	0.30714	1.09206	0.12706	0.45667	0.34	0.36
GSM2574755	GM12878	none	STAT2	0.32280	1.11907	0.16230	0.47406	0.32	0.36
GSM991659	IMR90	none	E2F7	0.31624	1.10371	0.14237	0.46704	0.33	0.36
GSM1876187	MCF-7	none	FOXN1	0.40986	1.19337	0.25504	0.56056	0.25	0.36
GSE69566.1	HepG2	none	ARID1A	0.31895	1.09731	0.13397	0.46904	0.33	0.36

ANEXOS

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

000008745e2000018471

CSV

GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida



GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular

Accession	Cell	Treatment	Transcription factor	p	OR	log2.OR	adj.p. value	log10.adj. p.value	Distance
wgEncodeEH001776	U2OS	none	TRIM28	0.31486	1.09192	0.12687	0.46621	0.33	0.35
GSM1407645	HEK293	none	ZBTB18	0.39498	1.17858	0.23705	0.54526	0.26	0.35
GSM1876186	MCF-7	none	FOXM1	0.33957	1.11884	0.16201	0.49092	0.31	0.35
GSM1239433	LoVo	none	MIXL1	0.45280	1.20437	0.26827	0.60317	0.22	0.35
GSM1239564	LoVo	none	ELF4	0.46505	1.20828	0.27295	0.61277	0.21	0.35
wgEncodeEH000748	K562	none	GTF3C2	0.37459	1.15012	0.20178	0.52441	0.28	0.35
GSE91663	K562	none	ZEB2	0.32570	1.08826	0.12203	0.47636	0.32	0.34
wgEncodeEH000731	GM18505	none	POLR2A	0.32991	1.09323	0.12859	0.48090	0.32	0.34
GSE91455	HEK293	none	ZNF639	0.32806	1.08781	0.12142	0.47916	0.32	0.34
GSM1122314	ME-1	none	ERG	0.33343	1.09414	0.12979	0.48372	0.32	0.34
wgEncodeEH002861	K562	none	ARID3A	0.33489	1.09500	0.13093	0.48518	0.31	0.34
GSE92062	K562	none	NCOR1	0.33087	1.08826	0.12202	0.48128	0.32	0.34
wgEncodeEH000760	K562	IFNg 30	STAT1	0.36530	1.13681	0.18499	0.52013	0.28	0.34
GSM1208694	LoVo	none	TFEB	0.36306	1.13221	0.17914	0.51762	0.29	0.34
GSM2466596	HEK293T	none	ZNF561	0.39461	1.15604	0.20919	0.54526	0.26	0.34
wgEncodeEH000681	K562	none	SIRT6	0.37635	1.13618	0.18419	0.52611	0.28	0.33
wgEncodeEH001797	K562	none	USF2	0.35566	1.10888	0.14911	0.50910	0.29	0.33
wgEncodeEH001843	HepG2	none	RFX5	0.36158	1.11008	0.15066	0.51620	0.29	0.32
wgEncodeEH002269	SK-N-SH	none	REST	0.35041	1.08537	0.11818	0.50359	0.30	0.32
GSM1239562	LoVo	none	DRAP1	0.48285	1.18867	0.24935	0.63070	0.20	0.32
GSE58685	hESC	none	PDX1	0.35316	1.08729	0.12074	0.50659	0.30	0.32
GSE92132	HEK293	none	ZBTB11	0.35891	1.08811	0.12182	0.51307	0.29	0.31
GSM1407637	HEK293	none	ZNF41	0.42469	1.14913	0.20054	0.57427	0.24	0.31
GSE91996	HEK293	none	MYNN	0.37380	1.09968	0.13708	0.52441	0.28	0.31
wgEncodeEH001872	HeLa-S3	none	ZZZ3	0.68101	1.22219	0.28947	0.78634	0.10	0.31
wgEncodeEH000401	HepG2	none	CTCF	0.38038	1.09497	0.13089	0.52905	0.28	0.31
wgEncodeEH000613	HeLa-S3	none	POLR2A	0.37237	1.08646	0.11963	0.52441	0.28	0.30
wgEncodeEH002079	A549	none	POLR2A	0.37295	1.08629	0.11941	0.52441	0.28	0.30
wgEncodeEH002853	GM12878	none	TBL1XR1	0.37710	1.08626	0.11937	0.52647	0.28	0.30
GSM558472	HeLa	none	PHF8	0.37429	1.08269	0.11462	0.52441	0.28	0.30
wgEncodeEH002343	GM12878	none	NFIC	0.37458	1.08191	0.11358	0.52441	0.28	0.30
wgEncodeEH000714	GM15510	none	POLR2A	0.37780	1.08457	0.11712	0.52677	0.28	0.30

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

000008745e2000018471

CSV

GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>



GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular



202

Accession	Cell	Treatment	Transcription factor	p	OR	log2.OR	adj.p. value	log10.adj. p.value	Distance
wgEncodeEH001211	K562	none	JUND	0.37222	1.08046	0.11164	0.52441	0.28	0.30
wgEncodeEH001520	GM12891	none	POU2F2	0.37436	1.07921	0.10997	0.52441	0.28	0.30
wgEncodeEH001579	H1-hESC	none	JUND	0.38121	1.07904	0.10975	0.52946	0.28	0.30
wgEncodeEH000399	K562	none	CTCF	0.39151	1.09098	0.12562	0.54300	0.27	0.29
GSM2466461	HEK293T	none	ZKSCAN3	0.73931	1.21217	0.27759	0.82960	0.08	0.29
wgEncodeEH001500	H1-hESC	none	TAF1	0.39962	1.08901	0.12302	0.54936	0.26	0.29
wgEncodeEH001635	H1-hESC	none	NANOG	0.40602	1.09718	0.13380	0.55672	0.25	0.29
wgEncodeEH001541	GM12878	none	RXRA	0.42124	1.10601	0.14537	0.57104	0.24	0.28
wgEncodeEH002842	H1-hESC	none	BACH1	0.39512	1.07457	0.10377	0.54526	0.26	0.28
GSM2466588	HEK293T	none	ZNF548	0.66968	1.19321	0.25485	0.77576	0.11	0.28
wgEncodeEH000677	K562	none	SETDB1	0.41927	1.09386	0.12942	0.56908	0.24	0.28
wgEncodeEH001620	K562	none	ZBTB7A	0.40786	1.07771	0.10797	0.55853	0.25	0.28
GSE96254	HepG2	none	TFE3	0.41615	1.07513	0.10451	0.56844	0.25	0.27
wgEncodeEH002312	A549	EtOH 0.02pct	TCF12	0.41884	1.07332	0.10208	0.56908	0.24	0.27
wgEncodeEH000629	HCT-116	none	TCF7L2	0.41786	1.07242	0.10087	0.56908	0.24	0.26
wgEncodeEH001638	K562	none	REST	0.41884	1.07103	0.09900	0.56908	0.24	0.26
GSE91495	K562	none	CREB3L1	0.44560	1.09852	0.13556	0.59579	0.22	0.26
GSM1239438	LoVo	none	NFKB1	0.62216	1.16899	0.22527	0.74729	0.13	0.26
GSE91989	HEK293	none	ZNF146	0.43460	1.07270	0.10124	0.58473	0.23	0.25
wgEncodeEH002418	NHEK	none	EZH2	0.44766	1.08117	0.11259	0.59781	0.22	0.25
GSM1208721	LoVo	none	CREB3L4	0.45447	1.08023	0.11133	0.60390	0.22	0.25
wgEncodeEH002860	HepG2	none	MAZ	0.44841	1.06979	0.09732	0.59807	0.22	0.24
wgEncodeEH000747	HeLa-S3	none	GTF3C2	0.57059	1.14144	0.19085	0.70742	0.15	0.24
GSE91981	HEK293	none	ZNF792	0.53203	1.12497	0.16988	0.67445	0.17	0.24
GSM2466612	HEK293T	none	ZNF613	0.55656	1.13437	0.18189	0.69651	0.16	0.24
wgEncodeEH001578	K562	none	SP1	0.45377	1.07012	0.09777	0.60372	0.22	0.24
GSM1065715	K562	30 min heatshock (42°C)	HSF2	0.47621	1.08711	0.12050	0.62278	0.21	0.24
wgEncodeEH001531	H1-hESC	none	TCF12	0.45806	1.06933	0.09670	0.60793	0.22	0.24
GSM2026836	HEK293	none	ZFP28	0.46753	1.07500	0.10434	0.61476	0.21	0.24
wgEncodeEH002856	HeLa-S3	none	MAFK	0.46911	1.06639	0.09273	0.61575	0.21	0.23
wgEncodeEH001811	GM12878	none	STAT3	0.58428	1.13107	0.17769	0.71619	0.14	0.23

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

000008745e2000018471

CSV

GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida



GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular

203

Accession	Cell	Treatment	Transcription factor	p	OR	log2.OR	adj.p. value	log10.adj. p.value	Distance
wgEncodeEH001798	GM12878	none	TBP	0.47238	1.06561	0.09168	0.61852	0.21	0.23
wgEncodeEH002852	GM12878	none	MAZ	0.47231	1.06396	0.08944	0.61852	0.21	0.23
wgEncodeEH002854	H1-hESC	none	SIN3A	0.48909	1.07094	0.09888	0.63808	0.20	0.22
GSM1239547	LoVo	none	ZNF639	0.55546	1.10601	0.14536	0.69594	0.16	0.21
wgEncodeEH001848	H1-hESC	none	TBP	0.50215	1.06742	0.09412	0.64881	0.19	0.21
wgEncodeEH002092	K562	none	PHF8	0.49951	1.06492	0.09075	0.64645	0.19	0.21
GSM2480806	LNCaP	none	ARID1A	0.50593	1.07108	0.09906	0.65291	0.19	0.21
wgEncodeEH001764	K562	none	TRIM28	0.54523	1.09406	0.12969	0.68552	0.16	0.21
wgEncodeEH001529	H1-hESC	none	SP1	0.49799	1.06250	0.08746	0.64645	0.19	0.21
GSE92176	K562	none	NCOA1	0.51155	1.07283	0.10142	0.65858	0.18	0.21
wgEncodeEH000606	ProgFib	none	POLR2A	0.51277	1.06132	0.08586	0.65936	0.18	0.20
wgEncodeEH001617	GM12878	none	ELF1	0.52404	1.06551	0.09154	0.66589	0.18	0.20
wgEncodeEH001550	HepG2	none	POLR2A	0.52341	1.06423	0.08980	0.66589	0.18	0.20
GSM1208720	LoVo	none	CREB3	0.53641	1.07119	0.09921	0.67681	0.17	0.20
GSM957607	T-ALL	none	TCF3	0.63354	1.11056	0.15129	0.75412	0.12	0.19
wgEncodeEH000648	HeLa-S3	none	MYC	0.51915	1.05628	0.07899	0.66419	0.18	0.19
GSE96009	iPSC	none	POU5F1	0.52352	1.05754	0.08072	0.66589	0.18	0.19
wgEncodeEH001863	K562	none	HMG3	0.52256	1.05739	0.08050	0.66589	0.18	0.19
GSE92092	K562	none	HDAC8	0.53016	1.05771	0.08095	0.67287	0.17	0.19
wgEncodeEH000743	GM19193	none	POLR2A	0.53385	1.05997	0.08402	0.67574	0.17	0.19
wgEncodeEH000693	MCF-7	none	E2F1	0.53574	1.05896	0.08264	0.67676	0.17	0.19
GSM744581	primary epidermal keratinocytes	none	NFKBIA	0.56427	1.07821	0.10864	0.70207	0.15	0.19
wgEncodeEH002021	K562	none	NFYA	0.54629	1.06396	0.08944	0.68606	0.16	0.19
wgEncodeEH002814	K562	none	RCOR1	0.53885	1.05712	0.08014	0.67909	0.17	0.19
GSM1239491	LoVo	none	BACH1	0.61791	1.09757	0.13431	0.74385	0.13	0.19
wgEncodeEH002031	SH-SY5Y	none	GATA3	0.54778	1.06097	0.08538	0.68712	0.16	0.18
wgEncodeEH002299	T-47D	BPA 100nM	ESR1	0.68369	1.10426	0.14308	0.78859	0.10	0.18
wgEncodeEH002316	H1-hESC	none	ATF2	0.57353	1.05370	0.07546	0.70786	0.15	0.17
wgEncodeEH001792	HepG2	none	POLR2A	0.57122	1.05306	0.07459	0.70742	0.15	0.17
GSM1407653	HEK293	none	ZNF33A	0.62733	1.07825	0.10869	0.75168	0.12	0.16

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

000008745e2000018471

CSV

GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida



GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular

ANEXOS

204

Accession	Cell	Treatment	Transcription factor	p	OR	log2.OR	adj.p. value	log10.adj. p.value	Distance
wgEncodeEH002344	HepG2	none	MYBL2	0.58217	1.05164	0.07264	0.71442	0.15	0.16
wgEncodeEH002855	HeLa-S3	none	MAZ	0.58141	1.05139	0.07230	0.71430	0.15	0.16
GSE91753	K562	none	MIER1	0.59491	1.06019	0.08432	0.72673	0.14	0.16
GSE91427	K562	none	TARDBP	0.59020	1.05209	0.07326	0.72262	0.14	0.16
GSM1538429	LNCaP	none	CREB1	0.60916	1.06088	0.08526	0.73856	0.13	0.16
wgEncodeEH002033	K562	none	RFX5	0.63202	1.06769	0.09449	0.75324	0.12	0.16
wgEncodeEH001645	GM12878	none	ZEB1	0.60035	1.05284	0.07428	0.73254	0.14	0.15
GSE91909	HepG2	none	TBX3	0.60920	1.05666	0.07951	0.73856	0.13	0.15
wgEncodeEH001515	HepG2	none	BHLHE40	0.60811	1.05557	0.07802	0.73856	0.13	0.15
wgEncodeEH001511	GM12892	none	POLR2A	0.60142	1.04820	0.06792	0.73303	0.13	0.15
GSM1525103	Jurkat	none	KDM3A	0.60435	1.04884	0.06880	0.73576	0.13	0.15
wgEncodeEH001463	GM12878	none	POLR2A	0.61536	1.05039	0.07093	0.74243	0.13	0.15
wgEncodeEH002164	K562	none	JUND	0.61484	1.05014	0.07058	0.74243	0.13	0.15
wgEncodeEH000759	HepG2	insulin	SREBF1	0.62160	1.05300	0.07450	0.74729	0.13	0.15
wgEncodeEH002383	K562	none	CBX3	0.61194	1.04624	0.06522	0.74003	0.13	0.15
wgEncodeEH002798	K562	IFNa 6h	IRF1	0.61748	1.04871	0.06861	0.74385	0.13	0.15
wgEncodeEH001826	HeLa-S3	none	MXI1	0.61199	1.04415	0.06233	0.74003	0.13	0.14
wgEncodeEH002841	GM12878	none	RCOR1	0.66688	1.06122	0.08572	0.77335	0.11	0.14
GSE91408	K562	none	ID3	0.62905	1.04465	0.06301	0.75168	0.12	0.14
wgEncodeEH001574	H1-hESC	none	EP300	0.63001	1.04457	0.06290	0.75168	0.12	0.14
wgEncodeEH001545	GM12891	none	PAX5	0.64595	1.05167	0.07268	0.76223	0.12	0.14
wgEncodeEH000721	HeLa-S3	none	SMARCC2	0.66543	1.05702	0.08000	0.77272	0.11	0.14
wgEncodeEH003083	HSMMtube	none	EZH2	0.66108	1.05576	0.07829	0.77272	0.11	0.14
wgEncodeEH001471	HepG2	none	SIN3A	0.63638	1.04255	0.06011	0.75508	0.12	0.14
wgEncodeEH001546	GM12892	none	PAX5	0.64148	1.04327	0.06111	0.75857	0.12	0.13
wgEncodeEH001662	K562	none	ATF3	0.64195	1.04302	0.06077	0.75857	0.12	0.13
wgEncodeEH000614	HeLa-S3	IFNg 30	STAT1	0.63908	1.04126	0.05833	0.75746	0.12	0.13
wgEncodeEH003435	MCF-7	Serum stimulated media	POL2	0.65227	1.04506	0.06358	0.76885	0.11	0.13
wgEncodeEH001672	HCT-116	none	ZBTB33	0.65569	1.04517	0.06374	0.77118	0.11	0.13
wgEncodeEH000561	HUVEC	none	MYC	0.66427	1.04464	0.06300	0.77272	0.11	0.13

ANEXOS

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

000008745e2000018471

CSV

GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida



GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular

Accession	Cell	Treatment	Transcription factor	p	OR	log2.OR	adj.p. value	log10.adj. p.value	Distance
wgEncodeEH003438	MCF-7	Serum starved media	POLR2A	0.65648	1.04214	0.05955	0.77127	0.11	0.13
wgEncodeEH002091	K562	none	HDAC2	0.66128	1.04200	0.05935	0.77272	0.11	0.13
GSM1239556	LoVo	none	CDC5L	0.73813	1.06923	0.09657	0.82915	0.08	0.13
wgEncodeEH002027	HeLa-S3	none	CHD2	0.66218	1.04092	0.05785	0.77272	0.11	0.13
wgEncodeEH001489	GM12878	none	PAX5	0.66485	1.04074	0.05762	0.77272	0.11	0.13
GSM2466544	HEK293T	none	ZNF383	0.72730	1.06196	0.08673	0.82300	0.08	0.12
wgEncodeEH000692	HeLa-S3	none	E2F6	0.67492	1.03920	0.05547	0.78099	0.11	0.12
wgEncodeEH002270	SK-N-SH	none	POLR2A	0.68802	1.03856	0.05459	0.79189	0.10	0.12
wgEncodeEH001498	H1-hESC	none	REST	0.68627	1.03749	0.05309	0.79072	0.10	0.11
GSE91469	K562	none	ATF1	0.70048	1.04415	0.06233	0.80228	0.10	0.11
GSM1208687	LoVo	none	TBX3	0.69514	1.03836	0.05431	0.79752	0.10	0.11
wgEncodeEH000733	GM18526	none	POLR2A	0.69478	1.03735	0.05290	0.79752	0.10	0.11
GSM1208792	LoVo	none	SATB1	0.70886	1.04189	0.05920	0.80820	0.09	0.11
GSE91470	K562	none	HES1	0.70969	1.04163	0.05885	0.80820	0.09	0.11
GSM1208637	LoVo	none	HSF2	0.72028	1.04558	0.06430	0.81772	0.09	0.11
wgEncodeEH002319	HepG2	none	NFIC	0.70227	1.03586	0.05082	0.80228	0.10	0.11
wgEncodeEH002858	HepG2	none	ARID3A	0.70094	1.03360	0.04768	0.80228	0.10	0.11
wgEncodeEH002321	GM12878	none	STAT5A	0.71145	1.03411	0.04839	0.80932	0.09	0.10
GSE92026	HEK293T	none	TARDBP	0.77229	1.05314	0.07470	0.85325	0.07	0.10
wgEncodeEH001553	PFSK-1	none	REST	0.72858	1.03678	0.05211	0.82358	0.08	0.10
wgEncodeEH002023	H1-hESC	none	JUND	0.72345	1.03414	0.04843	0.82036	0.09	0.10
wgEncodeEH001762	U2OS	none	SETDB1	0.73510	1.03574	0.05066	0.82661	0.08	0.10
GSM2466525	HEK293T	none	ZNF304	0.79670	1.05328	0.07489	0.86815	0.06	0.10
wgEncodeEH001567	H1-hESC	none	YY1	0.73075	1.03388	0.04807	0.82423	0.08	0.10
wgEncodeEH003086	HeLa-S3	none	EZH2	0.81134	1.05584	0.07839	0.87834	0.06	0.10
wgEncodeEH003210	K562	none	TRIM28	0.72458	1.03115	0.04425	0.82078	0.09	0.10
wgEncodeEH001475	GM12878	none	POU2F2	0.73096	1.03235	0.04593	0.82423	0.08	0.10
wgEncodeEH001816	HeLa-S3	none	GTF2F1	0.73145	1.03197	0.04540	0.82423	0.08	0.10
wgEncodeEH000536	K562	none	MYC	0.73414	1.03247	0.04610	0.82639	0.08	0.09
wgEncodeEH000751	HepG2	forskolin	ESRRA	0.76674	1.04290	0.06060	0.85048	0.07	0.09
GSM1208670	LoVo	none	RFX1	0.74766	1.03570	0.05061	0.83810	0.08	0.09

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

000008745e2000018471

CSV

GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>



GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular

Accession	Cell	Treatment	Transcription factor	p	OR	log2.OR	adj.p.value	log10.adj.p.value	Distance
GSM1239389	LoVo	none	CREB3L1	0.84109	1.05593	0.07851	0.89788	0.05	0.09
GSE96461	HepG2	none	CREM	0.76279	1.03046	0.04328	0.85048	0.07	0.08
GSM1624706	MDA-MB-231	none	TP53	0.75907	1.02767	0.03938	0.84912	0.07	0.08
GSE91509	K562	none	CDC5L	0.79072	1.03666	0.05195	0.86648	0.06	0.08
GSE91431	K562	none	RFX1	0.76368	1.02715	0.03865	0.85048	0.07	0.08
GSM1239499	LoVo	none	ELF2	0.76741	1.02638	0.03756	0.85048	0.07	0.08
GSE91745	GM12878	none	TARDBP	0.76739	1.02540	0.03618	0.85048	0.07	0.08
GSM2026846	HEK293	none	ZNF419	0.78316	1.03193	0.04534	0.86347	0.06	0.08
wgEncodeEH000042	K562	none	CTCF	0.80170	1.03116	0.04426	0.86878	0.06	0.08
GSM2026762	HEK293	none	ZNF250	0.78758	1.02802	0.03987	0.86481	0.06	0.07
wgEncodeEH001629	HeLa-S3	none	REST	0.78395	1.02704	0.03849	0.86347	0.06	0.07
wgEncodeEH001474	HeLa-S3	none	POLR2A	0.78690	1.02768	0.03939	0.86481	0.06	0.07
wgEncodeEH002278	HepG2	none	POLR2A	0.79353	1.02690	0.03830	0.86780	0.06	0.07
GSM2480804	LNCaP	none	ARID1A	0.81675	1.03385	0.04802	0.88330	0.05	0.07
wgEncodeEH001775	NT2-D1	none	ZNF274	0.83127	1.03595	0.05096	0.88916	0.05	0.07
GSE91709	K562	none	IRF2	0.79994	1.02174	0.03103	0.86815	0.06	0.07
GSM1842789	KH2 mESC	none	POU5F1	0.82065	1.02343	0.03342	0.88445	0.05	0.06
wgEncodeEH002802	H1-hESC	none	ZNF143	0.82236	1.02263	0.03229	0.88492	0.05	0.06
GSE105823	K562	none	MTA1	0.82451	1.02160	0.03083	0.88635	0.05	0.06
wgEncodeEH001517	GM12878	none	POLR2A	0.83024	1.01995	0.02849	0.88916	0.05	0.06
GSE101135	H1-hESC	none	CBX3	0.88403	1.03286	0.04665	0.93261	0.03	0.06
wgEncodeEH002823	GM12878	none	CHD1	0.87130	1.02752	0.03917	0.92099	0.04	0.05
wgEncodeEH000618	NB4	none	POLR2A	0.86173	1.01881	0.02688	0.91357	0.04	0.05
GSE96413	GM12878	none	CREM	0.86030	1.01826	0.02611	0.91295	0.04	0.05
GSM1239416	LoVo	none	HOXD9	0.85564	1.01373	0.01967	0.91041	0.04	0.05
wgEncodeEH002088	K562	none	CHD1	0.86386	1.01625	0.02326	0.91493	0.04	0.05
GSE96333	HepG2	none	ETV4	0.86537	1.01497	0.02143	0.91562	0.04	0.04
GSM2026866	HEK293	none	ZNF350	0.88031	1.01642	0.02350	0.92960	0.03	0.04
wgEncodeEH001659	H1-hESC	none	HDAC2	0.88509	1.01360	0.01948	0.93282	0.03	0.04
wgEncodeEH001551	HepG2	none	TAF1	0.89516	1.01387	0.01988	0.94250	0.03	0.03
wgEncodeEH000670	K562	IFNg 6h	MYC	0.89743	1.01414	0.02025	0.94333	0.03	0.03
wgEncodeEH000554	HepG2	none	POLR2A	0.89847	1.01314	0.01884	0.94333	0.03	0.03

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

000008745e2000018471

CSV

GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>



GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular

Accession	Cell	Treatment	Transcription factor	p	OR	log2.OR	adj.p.value	log10.adj.p.value	Distance
GSM2466522	HEK293T	none	ZNF2	0.91069	1.01303	0.01867	0.95511	0.02	0.03
GSE95909	K562	none	CREM	0.92289	1.01485	0.02127	0.96429	0.02	0.03
wgEncodeEH000680	K562	none	POLR3A	0.91491	1.01039	0.01491	0.95844	0.02	0.02
GSE91535	K562	none	ARNT	0.92356	1.01184	0.01698	0.96429	0.02	0.02
GSE91471	K562	none	CREB3	0.93244	1.00982	0.01409	0.96941	0.01	0.02
wgEncodeEH002281	SK-N-MC	none	POLR2A	0.92967	1.00963	0.01383	0.96932	0.01	0.02
wgEncodeEH000727	K562	none	POLR2A	0.93055	1.00763	0.01097	0.96932	0.01	0.02
wgEncodeEH003084	HUVEC	none	EZH2	0.95871	1.00755	0.01085	0.99308	0.00	0.01
wgEncodeEH001130	MCF-7	none	POLR2A	0.96554	1.00659	0.00948	0.99308	0.00	0.01
GSM1208659	LoVo	none	NFE2L2	0.96462	1.00629	0.00904	0.99308	0.00	0.01
GSE73725	h9 hESC	none	NANOG	0.96629	1.00536	0.00771	0.99308	0.00	0.01
wgEncodeEH002529	GM12878	none	FOXM1	0.96622	1.00501	0.00721	0.99308	0.00	0.01
GSM1122312	ME-1	none	FLI1	0.96500	1.00351	0.00505	0.99308	0.00	0.01
wgEncodeEH000763	HeLa-S3	none	BDP1	1.00000	1.00289	0.00416	1.00000	0.00	0.00
wgEncodeEH001831	GM12878	none	CHD2	1.00000	1.00197	0.00283	1.00000	0.00	0.00
GSM1407646	HEK293	none	ZSCAN31	1.00000	1.00178	0.00257	1.00000	0.00	0.00
wgEncodeEH000622	GM12878	none	FOS	1.00000	1.00068	0.00098	1.00000	0.00	0.00
wgEncodeEH002857	HeLa-S3	none	ZKSCAN1	1.00000	1.00045	0.00066	1.00000	0.00	0.00
wgEncodeEH000545	HepG2	none	MYC	1.00000	1.00039	0.00057	1.00000	0.00	0.00
wgEncodeEH001512	GM12892	none	POLR2A	1.00000	1.00024	0.00034	1.00000	0.00	0.00
wgEncodeEH002029	HepG2	none	MXI1	1.00000	0.99951	-0.00070	1.00000	0.00	0.00
wgEncodeEH000651	HCT-116	none	POLR2A	1.00000	0.99861	-0.00201	1.00000	0.00	0.00
wgEncodeEH001133	MCF-7	vehicle	MYC	1.00000	0.99850	-0.00217	1.00000	0.00	0.00
wgEncodeEH002796	HepG2	none	MAX	1.00000	0.99818	-0.00262	1.00000	0.00	0.00
wgEncodeEH001581	K562	none	POLR2A	0.96533	0.99682	-0.00460	0.99308	0.00	-0.01
wgEncodeEH001552	PANC-1	none	REST	1.00000	0.99595	-0.00585	1.00000	0.00	-0.01
wgEncodeEH001134	MCF-7	estrogen	MYC	1.00000	0.99567	-0.00627	1.00000	0.00	-0.01
GSM2026749	HEK293	none	KLF7	0.96404	0.99399	-0.00870	0.99308	0.00	-0.01
wgEncodeEH001549	HepG2	none	REST	0.96145	0.99281	-0.01041	0.99308	0.00	-0.01
wgEncodeEH000645	GM12878	none	POLR3G	1.00000	0.99237	-0.01105	1.00000	0.00	-0.01
GSM1208776	LoVo	none	NFKB2	0.96045	0.99204	-0.01153	0.99308	0.00	-0.01
wgEncodeEH002799	K562	IFNg 30	IRF1	0.96445	0.99202	-0.01157	0.99308	0.00	-0.01

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

000008745e2000018471

CSV

GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>



GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular

208

Accession	Cell	Treatment	Transcription factor	p	OR	log2.OR	adj.p. value	log10.adj. p.value	Distance
GSM1208698	LoVo	none	XBP1	0.95438	0.98783	-0.01767	0.99126	0.00	-0.02
wgEncodeEH002820	A549	none	MAX	0.93221	0.99136	-0.01252	0.96941	0.01	-0.02
GSM1239466	LoVo	none	IRF2	1.00000	0.98721	-0.01857	1.00000	0.00	-0.02
GSM2466491	HEK293T	none	ZNF197	1.00000	0.98622	-0.02002	1.00000	0.00	-0.02
GSE98983.2	HepG2	TNF	RELA	1.00000	0.98460	-0.02239	1.00000	0.00	-0.02
GSM959625	LS180	none	NCOA1	1.00000	0.98207	-0.02610	1.00000	0.00	-0.03
wgEncodeEH001790	HeLa-S3	none	TBP	0.89858	0.98671	-0.01930	0.94333	0.03	-0.03
GSE91789	MCF-7	none	SIN3A	0.85669	0.98332	-0.02427	0.91041	0.04	-0.05
wgEncodeEH001657	GM12878	none	YY1	0.85067	0.98305	-0.02467	0.90721	0.04	-0.05
wgEncodeEH000632	HEK293	none	POLR2A	0.83056	0.98211	-0.02604	0.88916	0.05	-0.06
GSE92077	GM12878	none	MYB	0.83257	0.97999	-0.02916	0.88968	0.05	-0.06
wgEncodeEH001779	HEK293	none	TRIM28	0.83013	0.98018	-0.02888	0.88916	0.05	-0.06
GSE105638	K562	none	RB1	0.82730	0.97919	-0.03033	0.88846	0.05	-0.06
GSE91907	HEK293	none	KLF7	0.81966	0.97750	-0.03284	0.88445	0.05	-0.06
wgEncodeEH001854	H1-hESC	none	JUN	0.92393	0.95722	-0.06308	0.96429	0.02	-0.07
wgEncodeEH001464	GM12878	none	SRF	0.79585	0.97628	-0.03463	0.86815	0.06	-0.07
GSE92059	MCF-7	none	RFX1	0.79889	0.97605	-0.03497	0.86815	0.06	-0.07
wgEncodeEH003436	MCF-7	Serum stimulated media	MYC	0.79192	0.97660	-0.03415	0.86692	0.06	-0.07
wgEncodeEH000669	K562	IFNa 6h	MYC	0.79867	0.97530	-0.03608	0.86815	0.06	-0.07
GSE106046	GM12878	none	RB1	0.79836	0.97514	-0.03632	0.86815	0.06	-0.07
GSM1065712	K562	none	HSF2	1.00000	0.94866	-0.07603	1.00000	0.00	-0.08
wgEncodeEH002266	PANC-1	none	SIN3A	0.79855	0.96720	-0.04812	0.86815	0.06	-0.08
wgEncodeEH002301	SK-N-SH	none	TAF1	0.76517	0.97455	-0.03718	0.85048	0.07	-0.08
wgEncodeEH001505	HeLa-S3	none	TAF1	0.76480	0.97432	-0.03753	0.85048	0.07	-0.08
wgEncodeEH002268	PFSK-1	none	SIN3A	1.00000	0.94443	-0.08248	1.00000	0.00	-0.08
GSM1693101	SK-N-SH	none	RARA	0.91564	0.94055	-0.08843	0.95844	0.02	-0.09
wgEncodeEH000754	HepG2	forskolin	HSF1	0.82110	0.94935	-0.07499	0.88445	0.05	-0.09
GSM2026837	HEK293	none	ZFP28	0.75640	0.96038	-0.05832	0.84701	0.07	-0.09
wgEncodeEH002064	GM12878	none	NFYA	0.78907	0.95245	-0.07028	0.86556	0.06	-0.09
wgEncodeEH002412	HMEC	none	EZH2	0.76576	0.95678	-0.06374	0.85048	0.07	-0.09
wgEncodeEH001788	HeLa-S3	none	IRF3	0.81785	0.94688	-0.07874	0.88361	0.05	-0.10

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

000008745e2000018471

CSV

GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida



GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular



209

Accession	Cell	Treatment	Transcription factor	p	OR	log2.OR	adj.p.value	log10.adj.p.value	Distance
GSM1239558	LoVo	none	CREBL2	0.85192	0.94219	-0.08591	0.90765	0.04	-0.10
GSM1239621	LoVo	none	ZBTB4	1.00000	0.93579	-0.09574	1.00000	0.00	-0.10
GSM1899558	VCaP	none	ERG	0.78326	0.95101	-0.07247	0.86347	0.06	-0.10
GSE101203	A549	none	PHF8	0.70155	0.96810	-0.04678	0.80228	0.10	-0.11
wgEncodeEH000678	K562	none	BDP1	1.00000	0.92253	-0.11634	1.00000	0.00	-0.12
wgEncodeEH001563	GM12878	none	BCLAF1	0.68065	0.96138	-0.05682	0.78634	0.10	-0.12
wgEncodeEH001804	HepG2	none	USF2	0.69372	0.94687	-0.07876	0.79752	0.10	-0.13
wgEncodeEH002833	K562	none	POLR2A	0.66419	0.95569	-0.06539	0.77272	0.11	-0.13
wgEncodeEH002095	H1-hESC	none	CHD1	0.65357	0.95737	-0.06285	0.76954	0.11	-0.13
wgEncodeEH000626	GM12878	none	POLR2A	0.64214	0.96092	-0.05752	0.75857	0.12	-0.13
GSE91444	MCF-7	none	HSF1	0.76313	0.92275	-0.11599	0.85048	0.07	-0.14
wgEncodeEH002323	A549	DEX 100nM	CREB1	0.63482	0.95735	-0.06289	0.75412	0.12	-0.14
wgEncodeEH001661	HepG2	none	YY1	0.62962	0.95661	-0.06400	0.75168	0.12	-0.14
GSM1538431	LNCaP	none	CREB1	0.62848	0.95234	-0.07044	0.75168	0.12	-0.14
GSM1208762	LoVo	none	JDP2	0.66562	0.93879	-0.09113	0.77272	0.11	-0.14
GSM2466495	HEK293T	none	ZNF211	1.00000	0.90400	-0.14561	1.00000	0.00	-0.15
GSM558471	HeLa	none	PHF8	0.63486	0.94611	-0.07992	0.75412	0.12	-0.15
GSM1239483	LoVo	none	PPARG	0.72035	0.91825	-0.12304	0.81772	0.09	-0.15
wgEncodeEH001866	K562	IFNg 6h	IRF1	0.58121	0.95182	-0.07125	0.71430	0.15	-0.16
wgEncodeEH000592	GM12878	none	POLR2A	0.57999	0.95137	-0.07193	0.71430	0.15	-0.16
wgEncodeEH002806	GM12878	none	MAX	0.57252	0.94975	-0.07437	0.70742	0.15	-0.17
wgEncodeEH002030	K562	none	ZNF143	0.56533	0.95036	-0.07345	0.70257	0.15	-0.17
wgEncodeEH001847	H1-hESC	none	NRF1	0.57239	0.94232	-0.08571	0.70742	0.15	-0.17
wgEncodeEH000547	GM12878	none	MYC	0.56634	0.94306	-0.08457	0.70302	0.15	-0.17
wgEncodeEH000757	HepG2	forskolin	PPARGC1A	0.78653	0.89251	-0.16406	0.86481	0.06	-0.18
wgEncodeEH000616	K562	none	POLR2A	0.53954	0.94568	-0.08058	0.67916	0.17	-0.19
wgEncodeEH002085	K562	none	KDM5B	0.51992	0.94678	-0.07891	0.66419	0.18	-0.19
wgEncodeEH000597	HeLa-S3	none	POLR2A	0.51671	0.94444	-0.08246	0.66205	0.18	-0.20
wgEncodeEH000710	GM12891	none	POLR2A	0.51417	0.94480	-0.08192	0.66037	0.18	-0.20
GSE53041.3	GM10861	80 min calcitriol	VDR	0.51590	0.94209	-0.08607	0.66180	0.18	-0.20
wgEncodeEH001623	K562	none	YY1	0.50673	0.94067	-0.08824	0.65316	0.18	-0.20
wgEncodeEH001513	GM12892	none	TAF1	0.49867	0.94348	-0.08394	0.64645	0.19	-0.21

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

000008745e2000018471

CSV

GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida



GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular

ANEXOS

Accession	Cell	Treatment	Transcription factor	p	OR	log2.OR	adj.p. value	log10.adj. p.value	Distance
wgEncodeEH001633	K562	none	POLR2A	0.49972	0.94105	-0.08765	0.64645	0.19	-0.21
wgEncodeEH000736	GM15510	TNFa	NFKB1	0.49758	0.94070	-0.08819	0.64645	0.19	-0.21
wgEncodeEH001757	H1-hESC	none	MAX	0.49537	0.94131	-0.08726	0.64470	0.19	-0.21
GSM1239549	LoVo	none	ARNTL2	0.77109	0.86795	-0.20432	0.85325	0.07	-0.22
GSM1065721	K562	30 min heatshock (42°C)	HSF1	0.53430	0.90785	-0.13947	0.67574	0.17	-0.22
GSM1239468	LoVo	none	KLF11	0.59109	0.88909	-0.16960	0.72289	0.14	-0.22
GSM1239537	LoVo	none	PBX2	0.66143	0.87292	-0.19607	0.77272	0.11	-0.23
wgEncodeEH001752	H1-hESC	none	SUZ12	0.56299	0.89047	-0.16736	0.70129	0.15	-0.23
wgEncodeEH001825	K562	none	TBP	0.46305	0.93903	-0.09076	0.61227	0.21	-0.23
wgEncodeEH001853	GM12878	none	ZNF143	0.46385	0.93857	-0.09146	0.61258	0.21	-0.23
wgEncodeEH001611	HepG2	none	SRF	0.46124	0.92325	-0.11521	0.61063	0.21	-0.24
wgEncodeEH000053	K562	none	POLR2A	0.44536	0.93528	-0.09652	0.59579	0.22	-0.24
wgEncodeEH001547	SK-N-SH	none	REST	0.44363	0.93614	-0.09520	0.59465	0.23	-0.24
wgEncodeEH001478	GM12878	none	TAF1	0.44226	0.93499	-0.09697	0.59354	0.23	-0.25
wgEncodeEH001766	PBDE	none	POLR2A	0.44099	0.93571	-0.09586	0.59258	0.23	-0.25
GSM2026828	HEK293	none	ZFP82	0.46779	0.91538	-0.12756	0.61476	0.21	-0.25
GSM1239497	LoVo	none	E2F2	0.85706	0.84447	-0.24388	0.91041	0.04	-0.25
GSE91448	MCF-7	none	RFX1	0.41705	0.93313	-0.09986	0.56894	0.24	-0.26
GSE105837	K562	none	HDAC1	0.39859	0.92813	-0.10760	0.54864	0.26	-0.28
wgEncodeEH000766	HeLa-S3	none	POLR3A	0.58022	0.84397	-0.24473	0.71430	0.15	-0.29
wgEncodeEH001636	H1-hESC	none	POU5F1	0.43413	0.88748	-0.17221	0.58473	0.23	-0.29
wgEncodeEH001571	K562	none	BCLAF1	0.39788	0.91295	-0.13140	0.54836	0.26	-0.29
wgEncodeEH001619	K562	none	ELF1	0.38043	0.92211	-0.11699	0.52905	0.28	-0.30
wgEncodeEH001671	HCT-116	none	YY1	0.37465	0.92572	-0.11135	0.52441	0.28	-0.30
GSE96121	HepG2	none	CREB1	0.37288	0.92477	-0.11284	0.52441	0.28	-0.30
wgEncodeEH002295	A549	EtOH 0.02pct	ZBTB33	0.36621	0.91294	-0.13140	0.52073	0.28	-0.31
wgEncodeEH001840	HepG2	none	CHD2	0.36809	0.90046	-0.15126	0.52271	0.28	-0.32
wgEncodeEH001609	GM12892	none	YY1	0.34772	0.92308	-0.11547	0.50107	0.30	-0.32
wgEncodeEH001641	HepG2	none	ELF1	0.33976	0.91920	-0.12155	0.49092	0.31	-0.33
wgEncodeEH001562	GM12878	none	ATF3	0.37258	0.88015	-0.18418	0.52441	0.28	-0.34
wgEncodeEH001209	K562	none	HDAC8	0.40250	0.85822	-0.22059	0.55260	0.26	-0.34

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

000008745e2000018471

CSV

GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida



GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular

211

Accession	Cell	Treatment	Transcription factor	p	OR	log2.OR	adj.p.value	log10.adj.p.value	Distance
wgEncodeEH001461	SK-N-MC	none	FOXP2	0.33014	0.91841	-0.12279	0.48090	0.32	-0.34
wgEncodeEH002265	PANC-1	none	POLR2A	0.32416	0.91652	-0.12577	0.47540	0.32	-0.35
wgEncodeEH002302	H1-hESC	none	SP2	0.34044	0.89237	-0.16428	0.49124	0.31	-0.35
wgEncodeEH000555	K562	none	POLR2A	0.31629	0.91665	-0.12555	0.46704	0.33	-0.35
GSM1208772	LoVo	none	MSX1	0.43277	0.82995	-0.26891	0.58446	0.23	-0.36
GSM1693103	SK-N-SH	retinoid acid	RARA	0.49182	0.81084	-0.30252	0.64085	0.19	-0.36
GSM1208648	LoVo	none	MEF2A	1.00000	0.77553	-0.36674	1.00000	0.00	-0.37
wgEncodeEH001523	GM12891	none	POLR2A	0.28940	0.91360	-0.13037	0.43756	0.36	-0.38
wgEncodeEH001554	U87	none	REST	0.29027	0.91201	-0.13289	0.43826	0.36	-0.38
GSM2466662	HEK293T	none	ZNF789	0.70971	0.77012	-0.37684	0.80820	0.09	-0.39
wgEncodeEH001814	HeLa-S3	none	BRCA1	0.28433	0.90430	-0.14513	0.43110	0.37	-0.39
GSM1208696	LoVo	none	TP53	0.31719	0.85742	-0.22193	0.46774	0.33	-0.40
wgEncodeEH001569	K562	none	ZBTB33	0.29402	0.88324	-0.17912	0.44089	0.36	-0.40
wgEncodeEH001514	H1-hESC	none	POLR2A	0.27527	0.90798	-0.13927	0.41914	0.38	-0.40
wgEncodeEH001524	GM12891	none	TAF1	0.27150	0.91060	-0.13510	0.41516	0.38	-0.40
wgEncodeEH001522	GM12891	none	POLR2A	0.26873	0.91063	-0.13506	0.41269	0.38	-0.41
GSM959626	LS180	3h calcitriol	NCOA1	0.56213	0.76937	-0.37825	0.70129	0.15	-0.41
wgEncodeEH001773	HEK293	none	ELK4	0.60940	0.74801	-0.41888	0.73856	0.13	-0.44
wgEncodeEH002849	K562	none	TBL1XR1	0.25217	0.87832	-0.18718	0.39118	0.41	-0.45
wgEncodeEH000621	K562	none	MYC	0.24487	0.89165	-0.16545	0.38261	0.42	-0.45
wgEncodeEH002026	GM12878	none	MXI1	0.23678	0.90416	-0.14535	0.37321	0.43	-0.45
wgEncodeEH002090	K562	none	HDAC1	0.23659	0.90370	-0.14608	0.37321	0.43	-0.45
wgEncodeEH001584	K562	none	YY1	0.23498	0.90254	-0.14794	0.37313	0.43	-0.45
wgEncodeEH000563	H1-hESC	none	POLR2A	0.23341	0.90331	-0.14670	0.37173	0.43	-0.45
GSM1239485	LoVo	none	RELB	0.39197	0.76445	-0.38751	0.54300	0.27	-0.47
wgEncodeEH002263	HepG2	none	REST	0.21979	0.90041	-0.15135	0.35746	0.45	-0.47
GSM1239398	LoVo	none	FOXO1	0.80032	0.72033	-0.47326	0.86815	0.06	-0.48
wgEncodeEH001615	SK-N-SH_RA	none	YY1	0.21633	0.89755	-0.15593	0.35342	0.45	-0.48
wgEncodeEH001858	GM12878	none	POLR2A	0.21611	0.89616	-0.15817	0.35342	0.45	-0.48
wgEncodeEH000698	GM12878	none	ZZZ3	0.66346	0.71985	-0.47423	0.77272	0.11	-0.49
wgEncodeEH001761	Raji	none	POLR2A	0.20493	0.89494	-0.16014	0.34006	0.47	-0.50
wgEncodeEH002275	A549	EtOH 0.02pct	TAF1	0.20421	0.89483	-0.16032	0.34006	0.47	-0.50

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

000008745e2000018471

CSV

GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida



GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular

ANEXOS

212

Accession	Cell	Treatment	Transcription factor	p	OR	log2.OR	adj.p. value	log10.adj. p.value	Distance
GSM2466601	HEK293T	none	ZNF567	0.66376	0.70900	-0.49613	0.77272	0.11	-0.51
wgEncodeEH002845	HepG2	none	RCOR1	0.56117	0.70637	-0.50151	0.70129	0.15	-0.52
wgEncodeEH001530	H1-hESC	none	SIN3A	0.18629	0.89040	-0.16748	0.31738	0.50	-0.53
GSM1405078	HeLa	none	AFF4	0.20769	0.83774	-0.25543	0.34305	0.46	-0.53
wgEncodeEH000705	GM10847	none	POLR2A	0.17603	0.88914	-0.16951	0.30264	0.52	-0.55
wgEncodeEH002320	K562	none	PML	0.17505	0.88901	-0.16973	0.30264	0.52	-0.55
GSE91727	MCF-7	none	MTA3	0.23250	0.79147	-0.33740	0.37083	0.43	-0.55
GSE91473	HEK293T	none	FOXA1	0.56279	0.68570	-0.54435	0.70129	0.15	-0.57
GSM1208612	LoVo	none	ELF2	0.17652	0.85462	-0.22665	0.30264	0.52	-0.57
wgEncodeEH002093	K562	none	RBBP5	0.15899	0.88592	-0.17476	0.27927	0.55	-0.58
GSE53041.4	GM10861	none	VDR	0.16096	0.86266	-0.21314	0.28135	0.55	-0.59
GSM1208775	LoVo	none	NFATC4	0.17943	0.80402	-0.31470	0.30666	0.51	-0.60
wgEncodeEH001566	H1-hESC	none	ATF3	0.15234	0.86732	-0.20536	0.27069	0.57	-0.60
wgEncodeEH000704	K562	IFNg 30	POLR2A	0.14223	0.88187	-0.18136	0.25653	0.59	-0.62
wgEncodeEH000662	K562	IFNg 6h	POLR2A	0.14029	0.87850	-0.18689	0.25436	0.59	-0.62
GSM2480800	LNCaP	none	AR	0.22236	0.73765	-0.43900	0.36053	0.44	-0.62
wgEncodeEH000769	K562	MNaseD	SETDB1	0.20479	0.74656	-0.42166	0.34006	0.47	-0.63
wgEncodeEH000671	K562	none	E2F4	0.13595	0.87893	-0.18618	0.24813	0.61	-0.63
wgEncodeEH002843	H1-hESC	none	GTF2F1	0.13402	0.85369	-0.22821	0.24544	0.61	-0.65
wgEncodeEH001822	K562	none	CHD2	0.12684	0.87051	-0.20007	0.23838	0.62	-0.65
GSM1208722	LoVo	none	CREM	0.13658	0.80658	-0.31011	0.24885	0.60	-0.68
wgEncodeEH002314	GM12878	none	REST	0.11761	0.86043	-0.21688	0.22693	0.64	-0.68
GSM1239383	LoVo	none	ARNTL	0.77173	0.62552	-0.67687	0.85325	0.07	-0.68
wgEncodeEH001533	H1-hESC	none	SRF	0.11816	0.84702	-0.23954	0.22693	0.64	-0.69
wgEncodeEH000659	K562	IFNa 30	MYC	0.10621	0.86372	-0.21137	0.20950	0.68	-0.71
wgEncodeEH001755	HepG2	none	ZNF274	1.00000	0.61007	-0.71296	1.00000	0.00	-0.71
wgEncodeEH001846	GM12878	none	NRF1	0.10280	0.85159	-0.23178	0.20426	0.69	-0.73
wgEncodeEH002294	A549	EtOH 0.02pct	GABPA	0.09761	0.86494	-0.20934	0.19540	0.71	-0.74
GSE79694	ES	none	FOXM1	0.11491	0.73881	-0.43672	0.22320	0.65	-0.78
wgEncodeEH000700	K562	none	ATF3	0.10867	0.75430	-0.40680	0.21318	0.67	-0.78
wgEncodeEH002795	H1-hESC	none	MYC	0.08700	0.84187	-0.24834	0.17882	0.75	-0.79
wgEncodeEH002826	H1-hESC	none	CHD1	0.09539	0.77009	-0.37690	0.19203	0.72	-0.81

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

000008745e2000018471

CSV

GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>



GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular

213

Accession	Cell	Treatment	Transcription factor	p	OR	log2.OR	adj.p.value	log10.adj.p.value	Distance
GSM831040	H1 ES	none	SAP30	0.07568	0.85936	-0.21867	0.16238	0.79	-0.82
wgEncodeEH000703	K562	none	GTF2B	0.08294	0.80993	-0.30414	0.17185	0.76	-0.82
wgEncodeEH000695	GM12878	none	YY1	0.12180	0.69137	-0.53246	0.23175	0.63	-0.83
wgEncodeEH001488	GM12878	none	ZBTB33	0.08028	0.79409	-0.33262	0.16956	0.77	-0.84
GSM1239463	LoVo	none	HOXB4	0.25121	0.59126	-0.75815	0.39081	0.41	-0.86
wgEncodeEH001808	GM12878	none	NFE2	0.22128	0.59488	-0.74933	0.35933	0.44	-0.87
GSE53041.2	GM10855	none	VDR	0.06913	0.80379	-0.31510	0.15197	0.82	-0.88
wgEncodeEH001580	K562	none	ETS1	0.06274	0.85294	-0.22949	0.14022	0.85	-0.88
GSE92159	MCF-7	none	NONO	0.09668	0.67219	-0.57306	0.19420	0.71	-0.91
GSE92164	K562	none	SIN3A	0.05735	0.84902	-0.23614	0.13089	0.88	-0.91
wgEncodeEH001655	K562	none	THAP1	0.05697	0.81816	-0.28954	0.13031	0.89	-0.93
wgEncodeEH003439	MCF-7	Serum starved media	MYC	0.05629	0.81462	-0.29579	0.12929	0.89	-0.94
wgEncodeEH001654	K562	none	TAF7	0.05263	0.80027	-0.32145	0.12246	0.91	-0.97
wgEncodeEH002311	A549	EtOH 0.02pct	REST	0.04788	0.83957	-0.25228	0.11362	0.94	-0.98
wgEncodeEH001568	HepG2	none	ATF3	0.04697	0.79939	-0.32303	0.11221	0.95	-1.00
wgEncodeEH001607	K562	none	SIN3A	0.04231	0.84110	-0.24965	0.10360	0.98	-1.02
wgEncodeEH001604	K562	none	GABPA	0.04134	0.84039	-0.25087	0.10323	0.99	-1.02
wgEncodeEH001573	GM12891	none	YY1	0.04128	0.83941	-0.25255	0.10323	0.99	-1.02
wgEncodeEH002289	A549	EtOH 0.02pct	ELF1	0.04229	0.83488	-0.26037	0.10360	0.98	-1.02
wgEncodeEH002827	H1-hESC	none	CHD2	0.04012	0.83107	-0.26696	0.10148	0.99	-1.03
wgEncodeEH002264	HepG2	none	SP2	0.04202	0.76059	-0.39481	0.10360	0.98	-1.06
wgEncodeEH000689	HeLa-S3	none	E2F4	0.04201	0.76013	-0.39568	0.10360	0.98	-1.06
wgEncodeEH001838	HeLa-S3	none	POLR2A	0.03448	0.83561	-0.25910	0.09106	1.04	-1.07
wgEncodeEH002829	H1-hESC	none	MXI1	0.03395	0.82284	-0.28132	0.09039	1.04	-1.08
wgEncodeEH001600	K562	none	SRF	0.03269	0.79654	-0.32818	0.08743	1.06	-1.11
GSM1208731	LoVo	none	E2F8	0.02968	0.82906	-0.27045	0.08309	1.08	-1.11
wgEncodeEH001582	K562	none	TAF1	0.02851	0.82805	-0.27222	0.08088	1.09	-1.13
wgEncodeEH001610	H1-hESC	none	TAF7	0.02788	0.82854	-0.27135	0.07993	1.10	-1.13
wgEncodeEH001653	K562	none	SP2	0.03068	0.78218	-0.35443	0.08407	1.08	-1.13
wgEncodeEH002801	H1-hESC	none	BRCA1	0.03195	0.74560	-0.42352	0.08608	1.07	-1.15
wgEncodeEH002308	GM12878	none	PML	0.02361	0.82485	-0.27779	0.07266	1.14	-1.17

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

000008745e2000018471

CSV

GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida



GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular

ANEXOS

214

Accession	Cell	Treatment	Transcription factor	p	OR	log2.OR	adj.p. value	log10.adj. p.value	Distance
wgEncodeEH000723	HeLa-S3	none	NRF1	0.02366	0.76796	-0.38091	0.07266	1.14	-1.20
GSE91880	K562	none	YBX3	0.07912	0.52126	-0.93992	0.16808	0.77	-1.22
wgEncodeEH001796	K562	none	NRF1	0.01554	0.78418	-0.35075	0.05523	1.26	-1.31
wgEncodeEH002867	GM12878	none	E2F4	0.01859	0.69161	-0.53197	0.06186	1.21	-1.32
GSE95956	K562	none	ATF1	0.01557	0.73161	-0.45085	0.05523	1.26	-1.34
wgEncodeEH002094	K562	none	SAP30	0.01248	0.80585	-0.31141	0.04791	1.32	-1.36
GSM1239498	LoVo	none	E2F8	0.01497	0.71387	-0.48627	0.05401	1.27	-1.36
wgEncodeEH000682	K562	none	NR2C2	0.02936	0.56600	-0.82113	0.08241	1.08	-1.36
wgEncodeEH000696	K562	none	ZNF274	0.52023	0.38943	-1.36056	0.66419	0.18	-1.37
wgEncodeEH001827	K562	none	MXI1	0.01175	0.79495	-0.33106	0.04578	1.34	-1.38
wgEncodeEH002866	GM08714	none	ZNF274	0.24428	0.40166	-1.31594	0.38225	0.42	-1.38
wgEncodeEH001504	HeLa-S3	none	GABPA	0.01088	0.79423	-0.33237	0.04307	1.37	-1.41
wgEncodeEH000661	K562	IFNa 6h	POLR2A	0.00947	0.80276	-0.31697	0.03886	1.41	-1.45
wgEncodeEH000697	GM12878	none	NR2C2	0.03414	0.49782	-1.00630	0.09063	1.04	-1.45
wgEncodeEH002317	H1-hESC	none	SP4	0.00893	0.78486	-0.34950	0.03748	1.43	-1.47
wgEncodeEH001548	HepG2	none	GABPA	0.00772	0.79714	-0.32709	0.03415	1.47	-1.50
wgEncodeEH001823	K562	none	GTF2F1	0.00821	0.75108	-0.41295	0.03530	1.45	-1.51
wgEncodeEH000660	K562	IFNa 30	POLR2A	0.00722	0.79571	-0.32969	0.03274	1.48	-1.52
wgEncodeEH001503	HepG2	none	ZBTB33	0.00790	0.69314	-0.52878	0.03467	1.46	-1.55
GSE91969	IMR90	none	ELK1	0.01596	0.50479	-0.98625	0.05571	1.25	-1.60
GSE96003	HepG2	none	ATF1	0.00299	0.74414	-0.42635	0.01798	1.75	-1.80
wgEncodeEH002028	HeLa-S3	none	ZNF143	0.00223	0.75017	-0.41471	0.01410	1.85	-1.90
wgEncodeEH001534	H1-hESC	none	GABPA	0.00216	0.74308	-0.42842	0.01383	1.86	-1.91
wgEncodeEH002282	A549	EtOH 0.02pct	YY1	0.00194	0.76407	-0.38822	0.01293	1.89	-1.93
wgEncodeEH000687	HeLa-S3	none	NR2C2	0.00231	0.57721	-0.79283	0.01453	1.84	-2.00
GSM2466501	HEK293T	none	ZNF224	0.18743	0.25763	-1.95661	0.31880	0.50	-2.02
GSE91713	MCF7	none	ELK1	0.00149	0.72150	-0.47092	0.01059	1.98	-2.03
wgEncodeEH002309	PFSK-1	none	TAF1	0.00139	0.68994	-0.53545	0.01015	1.99	-2.06
wgEncodeEH002851	GM12878	none	ELK1	0.00146	0.65197	-0.61712	0.01054	1.98	-2.07
wgEncodeEH001830	GM12878	none	BRCA1	0.00254	0.45489	-1.13642	0.01549	1.81	-2.14
wgEncodeEH001802	HepG2	none	NRF1	0.00311	0.41454	-1.27041	0.01826	1.74	-2.15
GSE96148	K562	none	DEAF1	0.00091	0.66102	-0.59724	0.00754	2.12	-2.21

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

000008745e2000018471

CSV

GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida



GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular

215

Accession	Cell	Treatment	Transcription factor	p	OR	log2.OR	adj.p.value	log10.adj.p.value	Distance
wgEncodeEH001753	HeLa-S3	none	ELK4	0.00073	0.72659	-0.46079	0.00647	2.19	-2.24
GSM2574747	HepG2	none	KLF10	0.00071	0.74925	-0.41649	0.00633	2.20	-2.24
wgEncodeEH001462	GM12878	none	GABPA	0.00070	0.73651	-0.44123	0.00633	2.20	-2.24
wgEncodeEH000675	HepG2	none	NR2C2	0.00069	0.67927	-0.55794	0.00631	2.20	-2.27
wgEncodeEH001859	HepG2	none	BRCA1	0.00251	0.37561	-1.41268	0.01539	1.81	-2.30
wgEncodeEH002868	GM12878	none	SIN3A	0.00057	0.70187	-0.51072	0.00571	2.24	-2.30
wgEncodeEH001528	H1-hESC	none	SIX5	0.00059	0.66058	-0.59820	0.00584	2.23	-2.31
wgEncodeEH000752	HepG2	forskolin	NR3C1	0.00134	0.39331	-1.34627	0.00996	2.00	-2.41
wgEncodeEH000653	NT2-D1	none	YY1	0.00022	0.69225	-0.53064	0.00279	2.55	-2.61
wgEncodeEH001564	GM12878	none	ETS1	0.00006	0.65778	-0.60431	0.00098	3.01	-3.07
wgEncodeEH002290	A549	EtOH 0.02pct	ETS1	0.00005	0.66652	-0.58528	0.00095	3.02	-3.08
wgEncodeEH000684	K562	none	YY1	0.00003	0.66293	-0.59306	0.00070	3.16	-3.21
wgEncodeEH003356	K562	none	ELK1	0.00002	0.59734	-0.74337	0.00044	3.36	-3.44
wgEncodeEH002096	H1-hESC	none	KDM5A	0.00001	0.49092	-1.02644	0.00018	3.75	-3.89
wgEncodeEH002864	HeLa-S3	none	ELK1	0.00000	0.53615	-0.89930	0.00013	3.87	-3.98
wgEncodeEH001483	K562	none	SIX5	0.00000	0.58977	-0.76177	0.00007	4.17	-4.24
wgEncodeEH002341	A549	EtOH 0.02pct	SIX5	0.00000	0.58967	-0.76202	0.00004	4.44	-4.50
GSM2574805	MCF7	none	KLF10	0.00000	0.55506	-0.84928	0.00000	5.43	-5.50
GSM2131193	T47D	none	KDM5A	0.00000	0.45719	-1.12914	0.00000	8.72	-8.79
wgEncodeEH001542	GM12878	none	SIX5	0.00000	0.46455	-1.10608	0.00000	9.38	-9.45
GSM1239443	LoVo	none	NR3C2	0.01090	0.00000	NA	0.04307	1.37	NA
wgEncodeEH000767	K562	none	BRF2	1.00000	0.00000	NA	1.00000	0.00	NA
wgEncodeEH001756	GM12878	none	ZNF274	1.00000	0.00000	NA	1.00000	0.00	NA
wgEncodeEH001763	HeLa-S3	none	ZNF274	0.62416	0.00000	NA	0.74885	0.13	NA
wgEncodeEH001800	HepG2	none	IRF3	1.00000	0.00000	NA	1.00000	0.00	NA
wgEncodeEH001855	HeLa-S3	none	SUPT20H	1.00000	0.00000	NA	1.00000	0.00	NA

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

000008745e2000018471

CSV

GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>



GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular

ANEXOS



## ANEXOS

## Tabla suplementaria 2

**Tabla suplementaria 2. Genes diferencialmente expresados en cultivos primarios de microglía expuestos a condiciones de hipoxia versus normoxia.** Genes que incrementan y disminuyen su expresión en cultivos primarios de microglía expuestos a condiciones de hipoxia (1% O<sub>2</sub>, 6 h) versus normoxia (21% O<sub>2</sub>, 6 h). (| log FC | > 0,5 y  $p < 0,05$ ).

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	<i>p</i>
<i>Egln3</i>	3,30	9,86	0,00000
<i>Gm16439</i>	2,49	5,60	0,00000
<i>Bnip3</i>	2,44	5,42	0,00000
<i>Ankrd37</i>	2,02	4,06	0,00001
<i>Ak4</i>	2,00	3,99	0,00000
<i>Gys1</i>	1,86	3,63	0,00000
<i>Adm</i>	1,86	3,62	0,00160
<i>Slc16a3</i>	1,80	3,48	0,00000
<i>Ero1l</i>	1,77	3,41	0,00000
<i>Egln1</i>	1,76	3,38	0,00000
<i>Gm14506</i>	1,72	3,29	0,00001
<i>Slc2a1</i>	1,72	3,29	0,00000
<i>Ndrgr1</i>	1,71	3,28	0,00472
<i>Prelid2</i>	1,67	3,18	0,00000
<i>Pgm2</i>	1,54	2,91	0,00000
<i>Pfkl</i>	1,45	2,73	0,00000
<i>Eno2</i>	1,37	2,59	0,00002
<i>Mthfd1l</i>	1,34	2,52	0,00000
<i>Fam162a</i>	1,32	2,49	0,00000
<i>Plod2</i>	1,31	2,48	0,00815
<i>Ccng2</i>	1,30	2,45	0,00003
<i>Bhlhe40</i>	1,25	2,38	0,00003
<i>Vegfa</i>	1,22	2,34	0,00033
<i>Scd2</i>	1,20	2,30	0,00000
<i>Pdk1</i>	1,19	2,29	0,00082
<i>Ier3</i>	1,18	2,26	0,00020
<i>Gm2011</i>	1,17	2,25	0,00003
<i>Ak3l2-ps</i>	1,15	2,21	0,00006
<i>Epm2a</i>	1,14	2,21	0,00012
<i>Tpi1</i>	1,10	2,15	0,00000
<i>Selenbp1</i>	1,10	2,15	0,00013
<i>Selenbp2</i>	1,08	2,12	0,00007
<i>Prr15</i>	1,07	2,10	0,00341
<i>Grhpr</i>	1,06	2,09	0,00006
<i>Gm16754</i>	1,06	2,08	0,00011
<i>Hk2</i>	1,02	2,03	0,00002



ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Appl2</i>	1,00	2,00	0,00004
<i>Gm26870</i>	0,97	1,96	0,00328
<i>Pfkfb3</i>	0,97	1,95	0,00001
<i>Gm9790</i>	0,95	1,93	0,00042
<i>Kdm5b</i>	0,95	1,93	0,00001
<i>Hilpda</i>	0,94	1,92	0,00013
<i>Mxi1</i>	0,89	1,86	0,00008
<i>Pgam1-ps2</i>	0,89	1,85	0,00001
<i>Hpse</i>	0,88	1,84	0,01728
<i>5330426P16Rik</i>	0,87	1,83	0,00047
<i>Gm20359</i>	0,87	1,83	0,00008
<i>Gm129</i>	0,87	1,82	0,00002
<i>Tbl2</i>	0,87	1,82	0,00003
<i>Narf</i>	0,86	1,82	0,00030
<i>Gm8910</i>	0,86	1,81	0,00017
<i>Kdm3a</i>	0,86	1,81	0,00002
<i>Mgarp</i>	0,85	1,81	0,00003
<i>Tifab</i>	0,85	1,80	0,00021
<i>Rest</i>	0,84	1,79	0,00001
<i>Rora</i>	0,83	1,77	0,00251
<i>Tmem45a</i>	0,82	1,76	0,01173
<i>Higd1a</i>	0,80	1,74	0,00005
<i>Eif4ebp1</i>	0,79	1,73	0,00109
<i>Tnfsf9</i>	0,78	1,71	0,00012
<i>Ticam2</i>	0,77	1,71	0,00035
<i>Ldha</i>	0,77	1,70	0,00002
<i>Mif</i>	0,76	1,70	0,00048
<i>Maged1</i>	0,74	1,68	0,00046
<i>Fbxo21</i>	0,74	1,67	0,00008
<i>Slc37a4</i>	0,74	1,67	0,00005
<i>Gm10169</i>	0,73	1,66	0,00049
<i>Pgam1</i>	0,72	1,65	0,00009
<i>Pfkip</i>	0,72	1,65	0,00617
<i>Ppme1</i>	0,72	1,65	0,00024
<i>Zfp292</i>	0,71	1,64	0,00042
<i>Ppp1r3c</i>	0,71	1,64	0,00362
<i>Alkbh5</i>	0,71	1,64	0,00002
<i>Sdc4</i>	0,71	1,64	0,00008
<i>Gm11203</i>	0,71	1,64	0,00010
<i>P4ha2</i>	0,71	1,63	0,00002
<i>Gm6097</i>	0,70	1,62	0,00060



## ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Pygl</i>	0,69	1,61	0,00398
<i>Gm17617</i>	0,69	1,61	0,00343
<i>Stc1</i>	0,68	1,60	0,00713
<i>mmu-mir-6363</i>	0,68	1,60	0,00010
<i>Jmjd6</i>	0,67	1,60	0,00018
<i>Gm16379</i>	0,67	1,60	0,00051
<i>Hyal1</i>	0,67	1,59	0,00116
<i>P4ha1</i>	0,67	1,59	0,00056
<i>Gm17035</i>	0,66	1,58	0,04665
<i>Gm4735</i>	0,65	1,57	0,00021
<i>Lonrf1</i>	0,65	1,57	0,00063
<i>Rlf</i>	0,65	1,56	0,00039
<i>Pnrc1</i>	0,64	1,56	0,00533
<i>Pvr</i>	0,64	1,56	0,00663
<i>Kdm4b</i>	0,64	1,56	0,00010
<i>Eno1</i>	0,64	1,55	0,00015
<i>Gbe1</i>	0,63	1,55	0,00387
<i>Helb</i>	0,63	1,54	0,00036
<i>Gm10197</i>	0,63	1,54	0,00417
<i>Tmem2</i>	0,62	1,54	0,00020
<i>Snx25</i>	0,62	1,54	0,00063
<i>Hk1</i>	0,62	1,54	0,00005
<i>Cdkn1b</i>	0,61	1,53	0,00043
<i>Olfir231</i>	0,61	1,53	0,00026
<i>Olfir420</i>	0,61	1,52	0,00025
<i>Errfi1</i>	0,60	1,51	0,02762
<i>1700001L05Rik</i>	0,59	1,51	0,00121
<i>Sema6b</i>	0,59	1,51	0,00398
<i>Pgk1</i>	0,58	1,49	0,00006
<i>Tiparp</i>	0,58	1,49	0,00700
<i>Gm5506</i>	0,58	1,49	0,00026
<i>Nadk2</i>	0,58	1,49	0,00074
<i>Gm14143</i>	0,57	1,49	0,00051
<i>Galk1</i>	0,57	1,49	0,00039
<i>Cytip</i>	0,57	1,49	0,00324
<i>Rnf19a</i>	0,57	1,48	0,00021
<i>Mir3109</i>	0,57	1,48	0,01204
<i>Fam13a</i>	0,57	1,48	0,00838
<i>Mir1957</i>	0,56	1,47	0,00447
<i>Gm12758</i>	0,56	1,47	0,00019
<i>Pgk1</i>	0,55	1,47	0,00008



ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Npepps</i>	0,55	1,47	0,00025
<i>Ndrg2</i>	0,55	1,47	0,00093
<i>Gm22843</i>	0,55	1,46	0,00113
<i>Agpat9</i>	0,55	1,46	0,00107
<i>Pgf</i>	0,55	1,46	0,02302
<i>Scd4</i>	0,55	1,46	0,00060
<i>Gm13685</i>	0,55	1,46	0,00156
<i>Gm5537</i>	0,54	1,46	0,00009
<i>Gm11110</i>	0,54	1,46	0,00012
<i>Gpi1</i>	0,54	1,46	0,00016
<i>Ddit4</i>	0,54	1,46	0,00044
<i>Gm15707</i>	0,54	1,45	0,00178
<i>Gm1840</i>	0,54	1,45	0,00041
<i>Fzd7</i>	0,53	1,45	0,00372
<i>Spry2</i>	0,53	1,44	0,00117
<i>Bhlhe41</i>	0,53	1,44	0,00091
<i>Tas2r131</i>	0,52	1,44	0,00208
<i>mmu-mir-6371</i>	0,52	1,44	0,01343
<i>Mir6371</i>	0,52	1,44	0,01343
<i>Kif21b</i>	0,52	1,44	0,00049
<i>Vhl</i>	0,52	1,44	0,00164
<i>Ccdc115</i>	0,52	1,43	0,00269
<i>Gm11814</i>	0,52	1,43	0,00585
<i>Olfr1146-ps1</i>	0,52	1,43	0,02688
<i>Arrdc3</i>	0,52	1,43	0,01203
<i>Gm24767</i>	0,52	1,43	0,00723
<i>Atg2b</i>	0,52	1,43	0,00017
<i>Gm14519</i>	0,51	1,43	0,00936
<i>Atf3</i>	0,51	1,43	0,00037
<i>Rgs11</i>	0,51	1,42	0,00102
<i>Gm13735</i>	0,51	1,42	0,00974
<i>Pdpx</i>	0,51	1,42	0,00370
<i>Impdh1</i>	0,50	1,42	0,00230
<i>Gm23245</i>	-0,50	0,71	0,00413
<i>Gm25810</i>	-0,50	0,71	0,02651
<i>Snord82</i>	-0,50	0,71	0,03705
<i>Rif1</i>	-0,50	0,71	0,01661
<i>Gm13419</i>	-0,50	0,71	0,02353
<i>mt-Te</i>	-0,50	0,71	0,00283
<i>Gm13798</i>	-0,50	0,70	0,01970
<i>Gm22743</i>	-0,51	0,70	0,01167



## ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Gm17404</i>	-0,51	0,70	0,02610
<i>Gm11966</i>	-0,51	0,70	0,01592
<i>Rpl13a-ps1</i>	-0,51	0,70	0,02539
<i>Gm12734</i>	-0,51	0,70	0,00825
<i>Gm14897</i>	-0,51	0,70	0,01745
<i>Xlr</i>	-0,51	0,70	0,02326
<i>Gm13340</i>	-0,51	0,70	0,02715
<i>Gm19760</i>	-0,51	0,70	0,00404
<i>Zfp935</i>	-0,51	0,70	0,03453
<i>Gm20199</i>	-0,51	0,70	0,03582
<i>Gm23455</i>	-0,51	0,70	0,00897
<i>Gm13215</i>	-0,51	0,70	0,02146
<i>Abce1</i>	-0,51	0,70	0,02972
<i>Gm22554</i>	-0,51	0,70	0,01976
<i>Gm5356</i>	-0,52	0,70	0,01884
<i>mt-Ts1</i>	-0,52	0,70	0,03942
<i>Gm10944</i>	-0,52	0,70	0,00361
<i>Snord11</i>	-0,52	0,70	0,01880
<i>Gm11581</i>	-0,52	0,70	0,01233
<i>Gm14284</i>	-0,52	0,70	0,00927
<i>Gm6335</i>	-0,52	0,70	0,04131
<i>Gm11849</i>	-0,52	0,70	0,00656
<i>Gm23422</i>	-0,52	0,70	0,02853
<i>Gm13139</i>	-0,52	0,70	0,00607
<i>Gm24233</i>	-0,52	0,70	0,01934
<i>Gm11556</i>	-0,52	0,70	0,00711
<i>Gm27018</i>	-0,52	0,70	0,01133
<i>Nol8</i>	-0,52	0,70	0,00761
<i>Gm14567</i>	-0,52	0,70	0,00605
<i>Hspe1-ps3</i>	-0,52	0,70	0,00186
<i>Gm20939</i>	-0,53	0,69	0,01524
<i>Gm25800</i>	-0,53	0,69	0,00136
<i>Gm24925</i>	-0,53	0,69	0,00874
<i>Gm5406</i>	-0,53	0,69	0,01099
<i>Gm17377</i>	-0,53	0,69	0,04059
<i>Gm26109</i>	-0,53	0,69	0,00766
<i>Gm9431</i>	-0,53	0,69	0,00273
<i>Gm10224</i>	-0,53	0,69	0,04545
<i>Gm10222</i>	-0,54	0,69	0,01077
<i>Gm15644</i>	-0,54	0,69	0,00472
<i>Gm15026</i>	-0,54	0,69	0,03196



ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Gm13235</i>	-0,54	0,69	0,01278
<i>mmu-mir-6928</i>	-0,54	0,69	0,00480
<i>Zfp72</i>	-0,54	0,69	0,01367
<i>Gm25206</i>	-0,54	0,69	0,00645
<i>Gm13140</i>	-0,54	0,69	0,00612
<i>Zfp97</i>	-0,54	0,69	0,01563
<i>Gm17449</i>	-0,54	0,69	0,01295
<i>Gm14429</i>	-0,54	0,69	0,02594
<i>Gm12647</i>	-0,54	0,69	0,01501
<i>Gm7816</i>	-0,55	0,69	0,02396
<i>Gm22765</i>	-0,55	0,68	0,00240
<i>Gm14238</i>	-0,55	0,68	0,01744
<i>Gm17555</i>	-0,55	0,68	0,03471
<i>Mir3098</i>	-0,55	0,68	0,03029
<i>Gm13416</i>	-0,55	0,68	0,00243
<i>mmu-mir-6399</i>	-0,56	0,68	0,03857
<i>Gm14541</i>	-0,56	0,68	0,00434
<i>DLEU2_5</i>	-0,56	0,68	0,01429
<i>Zfp930</i>	-0,56	0,68	0,00388
<i>Ccnc</i>	-0,56	0,68	0,00619
<i>Gm4076</i>	-0,56	0,68	0,00802
<i>Gm16111</i>	-0,56	0,68	0,02339
<i>Mir703</i>	-0,56	0,68	0,02414
<i>Gm15446</i>	-0,56	0,68	0,00328
<i>Gm15530</i>	-0,56	0,68	0,02349
<i>Hells</i>	-0,57	0,67	0,00006
<i>Gm17332</i>	-0,57	0,67	0,01775
<i>Gm4596</i>	-0,57	0,67	0,02619
<i>Gm24273</i>	-0,57	0,67	0,02435
<i>Rny1</i>	-0,57	0,67	0,01944
<i>Zfp932</i>	-0,57	0,67	0,01450
<i>Gm23926</i>	-0,57	0,67	0,04746
<i>Zfp932</i>	-0,58	0,67	0,00765
<i>Gm24253</i>	-0,58	0,67	0,01880
<i>Gm15683</i>	-0,58	0,67	0,00973
<i>Gm16210</i>	-0,58	0,67	0,02037
<i>Gm13076</i>	-0,58	0,67	0,00217
<i>Gm25970</i>	-0,58	0,67	0,00921
<i>OTTMUSG00000007634</i>	-0,58	0,67	0,03238
<i>Gm22786</i>	-0,58	0,67	0,00838
<i>Rnu73b</i>	-0,58	0,67	0,00122



## ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Gm10509</i>	-0,58	0,67	0,00755
<i>Ccl4</i>	-0,58	0,67	0,03173
<i>Gm24043</i>	-0,58	0,67	0,00113
<i>Gm23143</i>	-0,59	0,66	0,00251
<i>Gm24842</i>	-0,59	0,66	0,00764
<i>Gm12755</i>	-0,60	0,66	0,00604
<i>Gm24588</i>	-0,60	0,66	0,01473
<i>Gm11512</i>	-0,60	0,66	0,01847
<i>Gm5513</i>	-0,60	0,66	0,00562
<i>Gm13212</i>	-0,60	0,66	0,02788
<i>Mir467c</i>	-0,61	0,66	0,04018
<i>Zfp934</i>	-0,61	0,66	0,01855
<i>Gm25099</i>	-0,61	0,65	0,00490
<i>Gm26124</i>	-0,61	0,65	0,00426
<i>Gm25188</i>	-0,62	0,65	0,00173
<i>Gtpbp4</i>	-0,62	0,65	0,01184
<i>Gm23136</i>	-0,62	0,65	0,00097
<i>Gm13450</i>	-0,62	0,65	0,00557
<i>Gm24988</i>	-0,62	0,65	0,00909
<i>Rny1</i>	-0,62	0,65	0,00981
<i>Gm23344</i>	-0,63	0,65	0,01463
<i>Gm24463</i>	-0,63	0,65	0,01182
<i>Gm17312</i>	-0,63	0,64	0,04135
<i>Gm14421</i>	-0,63	0,64	0,02969
<i>Gm13248</i>	-0,63	0,64	0,00660
<i>Gm23003</i>	-0,64	0,64	0,00258
<i>Gm10770</i>	-0,64	0,64	0,02473
<i>Gm11307</i>	-0,64	0,64	0,01292
<i>Gm13341</i>	-0,64	0,64	0,01397
<i>Gm24095</i>	-0,65	0,64	0,01162
<i>3830403N18Rik</i>	-0,65	0,64	0,01751
<i>Chordc1</i>	-0,65	0,64	0,01773
<i>Nop58</i>	-0,66	0,63	0,02147
<i>Snora34</i>	-0,66	0,63	0,00311
<i>Gm14534</i>	-0,66	0,63	0,00093
<i>Snora19</i>	-0,66	0,63	0,00281
<i>Snora19</i>	-0,66	0,63	0,00281
<i>Gm24539</i>	-0,66	0,63	0,00924
<i>Gm26287</i>	-0,66	0,63	0,01640
<i>5430403G16Rik</i>	-0,66	0,63	0,00224
<i>Snord4a</i>	-0,67	0,63	0,00676





ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Gm13157</i>	-0,67	0,63	0,01214
<i>Gm26135</i>	-0,67	0,63	0,00931
<i>Gm16550</i>	-0,67	0,63	0,00008
<i>Gm12238</i>	-0,67	0,63	0,00042
<i>Gm6565</i>	-0,68	0,62	0,01737
<i>Gm26293</i>	-0,70	0,62	0,04785
<i>AF357399</i>	-0,70	0,61	0,00024
<i>Gm22455</i>	-0,71	0,61	0,01259
<i>RP23-48B17.1</i>	-0,71	0,61	0,00587
<i>Gm25776</i>	-0,71	0,61	0,00307
<i>Rnu5g</i>	-0,72	0,61	0,00075
<i>Rnu5g</i>	-0,72	0,61	0,00075
<i>Cycs</i>	-0,73	0,60	0,02151
<i>mt-Tt</i>	-0,74	0,60	0,02660
<i>Snord111</i>	-0,74	0,60	0,03326
<i>Gm15151</i>	-0,75	0,59	0,01443
<i>mt-Tn</i>	-0,76	0,59	0,00124
<i>Gm6712</i>	-0,76	0,59	0,00745
<i>Snord90</i>	-0,76	0,59	0,00489
<i>Ccl2</i>	-0,77	0,59	0,04822
<i>mt-Tg</i>	-0,77	0,59	0,01451
<i>mt-Th</i>	-0,77	0,59	0,00006
<i>Gm4883</i>	-0,78	0,58	0,00715
<i>Gm23287</i>	-0,79	0,58	0,00076
<i>Gm14870</i>	-0,80	0,57	0,01038
<i>Gm22508</i>	-0,80	0,57	0,00128
<i>Gm11410</i>	-0,82	0,57	0,00068
<i>Mirlet7f-1</i>	-0,83	0,56	0,00781
<i>Gm24916</i>	-0,84	0,56	0,01108
<i>Gm23406</i>	-0,85	0,56	0,01599
<i>Gm22571</i>	-0,85	0,55	0,01101
<i>Scarna9</i>	-0,86	0,55	0,00956
<i>Mir684-1</i>	-0,86	0,55	0,02383
<i>Tfrc</i>	-0,90	0,54	0,00001
<i>Gm13339</i>	-0,92	0,53	0,01033
<i>mt-Tm</i>	-0,92	0,53	0,00076
<i>Mir684-2</i>	-0,92	0,53	0,02536
<i>Gm10241</i>	-0,93	0,53	0,02214
<i>Gm10241</i>	-0,93	0,53	0,02214
<i>Gm10241</i>	-0,93	0,53	0,02214
<i>Gm10241</i>	-0,93	0,53	0,02214



## ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Gm10241</i>	-0,93	0,53	0,02214
<i>Snord72</i>	-0,95	0,52	0,00036
<i>Snord58b</i>	-0,97	0,51	0,00216
<i>Gm22354</i>	-0,97	0,51	0,00215
<i>Gm25848</i>	-0,99	0,50	0,00197
<i>Gm22265</i>	-1,02	0,49	0,00011
<i>Rgs18</i>	-1,05	0,48	0,03830
<i>mt-Tq</i>	-1,11	0,46	0,00001
<i>Snord70</i>	-1,21	0,43	0,01316
<i>mt-Tc</i>	-1,34	0,40	0,00069
<i>mt-Tf</i>	-1,38	0,39	0,00020
<i>mt-Tr</i>	-1,46	0,36	0,00087
<i>ND3</i>	-1,49	0,36	0,00022
<i>mt-Ta</i>	-1,50	0,35	0,00018
<i>mt-Tk</i>	-1,55	0,34	0,00044
<i>mt-Ty</i>	-1,92	0,26	0,00284



### Tabla suplementaria 3

**Tabla suplementaria 3. Genes incluidos en el GS "HMS".** Genes que incrementan su expresión en cultivos primarios de microglía expuestos a condiciones de hipoxia (1% O<sub>2</sub>, 6 h) *versus* normoxia (21% O<sub>2</sub>, 6 h). (log FC > 0,5 y  $p < 0,01$ ).

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	<i>p</i>
<i>Egln3</i>	3,30	9,86	0,0000
<i>Gm16439</i>	2,49	5,60	0,0000
<i>Bnip3</i>	2,44	5,42	0,0000
<i>Ankrd37</i>	2,02	4,06	0,0000
<i>Ak4</i>	2,00	3,99	0,0000
<i>Gys1</i>	1,86	3,63	0,0000
<i>Adm</i>	1,86	3,62	0,0016
<i>Slc16a3</i>	1,80	3,48	0,0000
<i>Ero1l</i>	1,77	3,41	0,0000
<i>Egln1</i>	1,76	3,38	0,0000
<i>Gm14506</i>	1,72	3,29	0,0000
<i>Slc2a1</i>	1,72	3,29	0,0000
<i>Ndrgr1</i>	1,71	3,28	0,0047
<i>Prelid2</i>	1,67	3,18	0,0000
<i>Pgm2</i>	1,54	2,91	0,0000
<i>Pfkl</i>	1,45	2,73	0,0000
<i>Eno2</i>	1,37	2,59	0,0000
<i>Mthfd1l</i>	1,34	2,52	0,0000
<i>Fam162a</i>	1,32	2,49	0,0000
<i>Plod2</i>	1,31	2,48	0,0081
<i>Ccng2</i>	1,30	2,45	0,0000
<i>Bhlhe40</i>	1,25	2,38	0,0000
<i>Vegfa</i>	1,22	2,34	0,0003
<i>Scd2</i>	1,20	2,30	0,0000
<i>Pdk1</i>	1,19	2,29	0,0008
<i>Ier3</i>	1,18	2,26	0,0002
<i>Gm2011</i>	1,17	2,25	0,0000
<i>Ak3l2-ps</i>	1,15	2,21	0,0001
<i>Epm2a</i>	1,14	2,21	0,0001
<i>Tpi1</i>	1,10	2,15	0,0000
<i>Selenbp1</i>	1,10	2,15	0,0001
<i>Selenbp2</i>	1,08	2,12	0,0001
<i>Prr15</i>	1,07	2,10	0,0034
<i>Grhpr</i>	1,06	2,09	0,0001
<i>Gm16754</i>	1,06	2,08	0,0001
<i>Hk2</i>	1,02	2,03	0,0000
<i>Appl2</i>	1,00	2,00	0,0000



## ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	<i>p</i>
<i>Gm26870</i>	0,97	1,96	0,0033
<i>Pfkfb3</i>	0,97	1,95	0,0000
<i>Gm9790</i>	0,95	1,93	0,0004
<i>Kdm5b</i>	0,95	1,93	0,0000
<i>Hilpda</i>	0,94	1,92	0,0001
<i>Mxi1</i>	0,89	1,86	0,0001
<i>Pgam1-ps2</i>	0,89	1,85	0,0000
<i>5330426P16Rik</i>	0,87	1,83	0,0005
<i>Gm20359</i>	0,87	1,83	0,0001
<i>Gm129</i>	0,87	1,82	0,0000
<i>Tbl2</i>	0,87	1,82	0,0000
<i>Narf</i>	0,86	1,82	0,0003
<i>Gm8910</i>	0,86	1,81	0,0002
<i>Kdm3a</i>	0,86	1,81	0,0000
<i>Mgarp</i>	0,85	1,81	0,0000
<i>Tifab</i>	0,85	1,80	0,0002
<i>Rest</i>	0,84	1,79	0,0000
<i>Rora</i>	0,83	1,77	0,0025
<i>Higd1a</i>	0,80	1,74	0,0000
<i>Eif4ebp1</i>	0,79	1,73	0,0011
<i>Tnfsf9</i>	0,78	1,71	0,0001
<i>Ticam2</i>	0,77	1,71	0,0004
<i>Ldha</i>	0,77	1,70	0,0000
<i>Mif</i>	0,76	1,70	0,0005
<i>Maged1</i>	0,74	1,68	0,0005
<i>Fbxo21</i>	0,74	1,67	0,0001
<i>Slc37a4</i>	0,74	1,67	0,0000
<i>Gm10169</i>	0,73	1,66	0,0005
<i>Pgam1</i>	0,72	1,65	0,0001
<i>Pfkip</i>	0,72	1,65	0,0062
<i>Ppme1</i>	0,72	1,65	0,0002
<i>Zfp292</i>	0,71	1,64	0,0004
<i>Ppp1r3c</i>	0,71	1,64	0,0036
<i>Alkbh5</i>	0,71	1,64	0,0000
<i>Sdc4</i>	0,71	1,64	0,0001
<i>Gm11203</i>	0,71	1,64	0,0001
<i>P4ha2</i>	0,71	1,63	0,0000
<i>Gm6097</i>	0,70	1,62	0,0006
<i>Pygl</i>	0,69	1,61	0,0040
<i>Gm17617</i>	0,69	1,61	0,0034
<i>Stc1</i>	0,68	1,60	0,0071



ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>mmu-mir-6363</i>	0,68	1,60	0,0001
<i>Jmjd6</i>	0,67	1,60	0,0002
<i>Gm16379</i>	0,67	1,60	0,0005
<i>Hyal1</i>	0,67	1,59	0,0012
<i>P4ha1</i>	0,67	1,59	0,0006
<i>Gm4735</i>	0,65	1,57	0,0002
<i>Lonrf1</i>	0,65	1,57	0,0006
<i>Rlf</i>	0,65	1,56	0,0004
<i>Pnrc1</i>	0,64	1,56	0,0053
<i>Pvr</i>	0,64	1,56	0,0066
<i>Kdm4b</i>	0,64	1,56	0,0001
<i>Eno1</i>	0,64	1,55	0,0001
<i>Gbe1</i>	0,63	1,55	0,0039
<i>Helb</i>	0,63	1,54	0,0004
<i>Gm10197</i>	0,63	1,54	0,0042
<i>Tmem2</i>	0,62	1,54	0,0002
<i>Snx25</i>	0,62	1,54	0,0006
<i>Hk1</i>	0,62	1,54	0,0000
<i>Cdkn1b</i>	0,61	1,53	0,0004
<i>Olfr231</i>	0,61	1,53	0,0003
<i>Olfr420</i>	0,61	1,52	0,0003
<i>1700001L05Rik</i>	0,59	1,51	0,0012
<i>Sema6b</i>	0,59	1,51	0,0040
<i>Pgk1</i>	0,58	1,49	0,0001
<i>Tiparp</i>	0,58	1,49	0,0070
<i>Gm5506</i>	0,58	1,49	0,0003
<i>Nadk2</i>	0,58	1,49	0,0007
<i>Gm14143</i>	0,57	1,49	0,0005
<i>Galk1</i>	0,57	1,49	0,0004
<i>Cytip</i>	0,57	1,49	0,0032
<i>Rnf19a</i>	0,57	1,48	0,0002
<i>Fam13a</i>	0,57	1,48	0,0084
<i>Mir1957</i>	0,56	1,47	0,0045
<i>Gm12758</i>	0,56	1,47	0,0002
<i>Pgk1</i>	0,55	1,47	0,0001
<i>Npepps</i>	0,55	1,47	0,0002
<i>Ndrp2</i>	0,55	1,47	0,0009
<i>Gm22843</i>	0,55	1,46	0,0011
<i>Agpat9</i>	0,55	1,46	0,0011
<i>Scd4</i>	0,55	1,46	0,0006
<i>Gm13685</i>	0,55	1,46	0,0016



## ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	<i>p</i>
<i>Gm5537</i>	0,54	1,46	0,0001
<i>Gm11110</i>	0,54	1,46	0,0001
<i>Gpi1</i>	0,54	1,46	0,0002
<i>Ddit4</i>	0,54	1,46	0,0004
<i>Gm15707</i>	0,54	1,45	0,0018
<i>Gm1840</i>	0,54	1,45	0,0004
<i>Fzd7</i>	0,53	1,45	0,0037
<i>Spry2</i>	0,53	1,44	0,0012
<i>Bhlhe41</i>	0,53	1,44	0,0009
<i>Tas2r131</i>	0,52	1,44	0,0021
<i>Kif21b</i>	0,52	1,44	0,0005
<i>Vhl</i>	0,52	1,44	0,0016
<i>Ccdc115</i>	0,52	1,43	0,0027
<i>Gm11814</i>	0,52	1,43	0,0058
<i>Gm24767</i>	0,52	1,43	0,0072
<i>Atg2b</i>	0,52	1,43	0,0002
<i>Gm14519</i>	0,51	1,43	0,0094
<i>Atf3</i>	0,51	1,43	0,0004
<i>Rgs11</i>	0,51	1,42	0,0010
<i>Gm13735</i>	0,51	1,42	0,0097
<i>Pdyp</i>	0,51	1,42	0,0037
<i>Impdh1</i>	0,50	1,42	0,0023



## Tabla suplementaria 4

**Tabla suplementaria 4. Genes incluidos en el GS "MGnD".** Genes que incrementan su expresión en diferentes modelos de DAM (Krasemann et al., 2017).

Nombre del gen
<i>ApoE</i>
<i>Axl</i>
<i>Ccl2</i>
<i>Tlr2</i>
<i>Spp1</i>
<i>Cybb</i>
<i>Msr1</i>
<i>Itgax</i>
<i>Clec7a</i>
<i>Chi3l3</i>
<i>Arg1</i>
<i>Siglec1</i>
<i>Cfp</i>
<i>Cxcl10</i>
<i>Alcam</i>
<i>Fer1l3</i>
<i>Lilrb4</i>
<i>Gpx3</i>
<i>Gas7</i>
<i>Ccr12</i>
<i>Cxcl16</i>
<i>Cxcr4</i>
<i>Gpnmb</i>
<i>Lgals3</i>
<i>Ifi202b</i>
<i>Csf1</i>
<i>Lirb4</i>
<i>Lag3</i>





## ANEXOS

## Tabla suplementaria 5

**Tabla suplementaria 5. Genes diferencialmente expresados en la microglía de ratones *APP<sup>751SL</sup>* versus a la de ratones WT.** Genes que incrementan y disminuyen su expresión en la microglía de ratones *APP<sup>751SL</sup>* de 12 meses de edad versus a la microglía de ratones WT de 12 meses de edad. ( $|\log FC| > 0,5$  y  $p < 0,05$ ).

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Clec7a</i>	8,88	469,74	0,00000
<i>Igf1</i>	8,12	277,5	0,00000
<i>Cst7</i>	7,93	243,44	0,00000
<i>Axl</i>	7,89	237,54	0,00000
<i>Apoe</i>	7,81	224,75	0,00000
<i>Spp1</i>	7,38	166,69	0,00000
<i>Cd200r4</i>	6,20	73,29	0,00000
<i>Etl4</i>	6,08	67,57	0,00000
<i>Gpnmb</i>	5,84	57,14	0,00000
<i>Fabp3</i>	5,79	55,32	0,00000
<i>Ifi204</i>	5,77	54,72	0,00000
<i>Itgax</i>	5,74	53,51	0,00000
<i>Fabp5</i>	5,71	52,3	0,00000
<i>Al607873</i>	5,59	48,32	0,00000
<i>Egln3</i>	5,44	43,53	0,00000
<i>Mnda</i>	5,39	41,93	0,00000
<i>Cybb</i>	5,39	41,79	0,00000
<i>Ifitm3</i>	5,37	41,28	0,00000
<i>Nfil3</i>	5,16	35,75	0,00000
<i>Myo1e</i>	5,11	34,58	0,00000
<i>Lilrb4a</i>	5,08	33,89	0,00000
<i>Slfn5</i>	4,82	28,16	0,00000
<i>Ank; Mir7117</i>	4,73	26,47	0,00000
<i>Cdkn1a</i>	4,63	24,78	0,00000
<i>Clic4</i>	4,55	23,35	0,00000
<i>Plin2</i>	4,54	23,21	0,00000
<i>Il1rn</i>	4,52	22,92	0,00000
<i>Anxa5</i>	4,43	21,57	0,00000
<i>Sdc3</i>	4,29	19,51	0,00000
<i>Hcar2</i>	4,20	18,33	0,00000
<i>Plaur</i>	4,11	17,31	0,00000
<i>Itga5</i>	4,11	17,23	0,00000
<i>Ch25h</i>	4,09	17,06	0,00003
<i>Ptgs2</i>	3,95	15,46	0,00000
<i>Gm1673</i>	3,95	15,43	0,00000
<i>Ell2</i>	3,88	14,7	0,00000
<i>Cd69</i>	3,87	14,61	0,00000



ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Csf1</i>	3,85	14,43	0,00000
<i>Mmp12</i>	3,85	14,39	0,00003
<i>Ptger4</i>	3,79	13,88	0,00000
<i>Wfdc17</i>	3,78	13,78	0,00000
<i>Ctla2a</i>	3,77	13,63	0,00004
<i>Mamdc2</i>	3,73	13,31	0,00000
<i>Anxa2</i>	3,68	12,86	0,00000
<i>Lyz2</i>	3,68	12,83	0,00000
<i>Gcnt2</i>	3,68	12,81	0,00000
<i>Lgals3bp</i>	3,68	12,8	0,00000
<i>Cxcl2</i>	3,67	12,75	0,00001
<i>Cxcr4</i>	3,63	12,4	0,00000
<i>Vat1</i>	3,61	12,22	0,00000
<i>Oas1a</i>	3,60	12,11	0,00000
<i>Samd9l</i>	3,55	11,75	0,00000
<i>Cpd</i>	3,54	11,63	0,00000
<i>Cxcl13</i>	3,50	11,35	0,00000
<i>Cd74; Mir5107</i>	3,50	11,31	0,00000
<i>Hbb-bs; Hbb-b1</i>	3,49	11,2	0,00260
<i>Adssl1</i>	3,48	11,12	0,00000
<i>Tpi1</i>	3,47	11,08	0,00000
<i>Cox6a2</i>	3,47	11,07	0,00000
<i>Oas1g</i>	3,47	11,05	0,00000
<i>St8sia6</i>	3,44	10,85	0,00000
<i>Lilr4b</i>	3,42	10,73	0,00000
<i>Gpr65</i>	3,41	10,65	0,00000
<i>Capg</i>	3,39	10,48	0,00000
<i>Glpr1</i>	3,37	10,33	0,00000
<i>Hif1a</i>	3,32	10	0,00000
<i>Il1b</i>	3,30	9,84	0,00001
<i>Ptchd1</i>	3,30	9,82	0,00000
<i>Smim3</i>	3,28	9,69	0,00000
<i>Ccl6</i>	3,28	9,68	0,00000
<i>Olfr110</i>	3,24	9,47	0,00000
<i>Atp1a3</i>	3,22	9,32	0,00000
<i>Ero1l</i>	3,20	9,21	0,00000
<i>Ctse</i>	3,19	9,11	0,00000
<i>Pacsin1</i>	3,18	9,09	0,00002
<i>Lgi2</i>	3,17	8,99	0,00002
<i>Milr1</i>	3,16	8,94	0,00000
<i>Lrpap1</i>	3,16	8,91	0,00000



## ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Ifi27l2a</i>	3,15	8,85	0,00000
<i>Nceh1</i>	3,13	8,75	0,00000
<i>St14</i>	3,12	8,67	0,00000
<i>Rtp4</i>	3,11	8,64	0,00000
<i>Rai14</i>	3,10	8,58	0,00000
<i>Bst2</i>	3,09	8,51	0,00000
<i>Adarb1</i>	3,08	8,48	0,00000
<i>Bhlhe40</i>	3,05	8,31	0,00000
<i>Ldlr</i>	3,04	8,23	0,00000
<i>Rhoc</i>	3,03	8,16	0,00000
<i>Spryd7</i>	3,02	8,13	0,00000
<i>Ifitm2</i>	3,02	8,11	0,00000
<i>Aplp2</i>	3,02	8,09	0,00000
<i>Phlda1</i>	3,01	8,07	0,00000
<i>Gch1</i>	2,97	7,84	0,00000
<i>Mif</i>	2,96	7,8	0,00000
<i>Olfr111</i>	2,94	7,68	0,00000
<i>AI504432</i>	2,94	7,66	0,00000
<i>Got1</i>	2,93	7,64	0,00000
<i>Cd14</i>	2,92	7,56	0,00000
<i>Usp18</i>	2,90	7,48	0,00000
<i>Fxyd5; Mir7050</i>	2,90	7,48	0,00002
<i>Sp100</i>	2,90	7,47	0,00000
<i>Prdx4</i>	2,90	7,47	0,00001
<i>Ly9</i>	2,89	7,43	0,00001
<i>Sdc4</i>	2,87	7,32	0,00000
<i>Rab7b</i>	2,87	7,31	0,00000
<i>Rftn1</i>	2,86	7,26	0,00000
<i>Masp1</i>	2,85	7,22	0,00000
<i>Tmppe; Glb1</i>	2,84	7,18	0,00000
<i>Tmem154</i>	2,84	7,17	0,00000
<i>Slc2a1</i>	2,82	7,07	0,00000
<i>Slfn2</i>	2,80	6,98	0,00003
<i>Pkm</i>	2,80	6,96	0,00001
<i>Serpine2</i>	2,79	6,9	0,00000
<i>Ephx1</i>	2,76	6,77	0,00000
<i>Clec1a</i>	2,74	6,66	0,00004
<i>Alcam</i>	2,71	6,53	0,00000
<i>Ramp1</i>	2,69	6,45	0,00000
<i>Pyhin1</i>	2,69	6,45	0,00000
<i>Irak3</i>	2,67	6,35	0,00010



ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Ctla2b</i>	2,66	6,34	0,00001
<i>H2-L; H2-D1</i>	2,66	6,3	0,00000
<i>Cd44</i>	2,65	6,26	0,00000
<i>Rtcb</i>	2,64	6,24	0,00000
<i>Echs1</i>	2,64	6,23	0,00010
<i>Gng12</i>	2,63	6,21	0,00000
<i>1500012F01Rik; Snord12</i>	2,63	6,17	0,00000
<i>Cd63</i>	2,63	6,17	0,00000
<i>Apbb2</i>	2,61	6,11	0,00000
<i>Hpse</i>	2,61	6,09	0,00001
<i>Gusb</i>	2,59	6,04	0,00000
<i>Tmem106a</i>	2,59	6,04	0,00001
<i>Gm1966</i>	2,59	6,01	0,00000
<i>Ndufa1</i>	2,58	5,98	0,00000
<i>Ttyh2</i>	2,56	5,91	0,00002
<i>Tlr2</i>	2,56	5,88	0,00001
<i>Psmb6</i>	2,55	5,87	0,00000
<i>Ggh</i>	2,54	5,8	0,00000
<i>Fcgr4</i>	2,53	5,77	0,00001
<i>Rnf149</i>	2,52	5,75	0,00004
<i>Tubb6</i>	2,52	5,75	0,00003
<i>Prdm1</i>	2,52	5,74	0,00000
<i>Dab2</i>	2,51	5,69	0,00002
<i>Plpp1</i>	2,49	5,6	0,00000
<i>Dkk2</i>	2,48	5,59	0,00000
<i>Rilpl2</i>	2,48	5,58	0,00002
<i>Actr3b</i>	2,47	5,54	0,00000
<i>Mndal</i>	2,46	5,52	0,00001
<i>Cd52</i>	2,46	5,52	0,00000
<i>Tmem205</i>	2,46	5,5	0,00000
<i>Tnfaip2</i>	2,46	5,5	0,00020
<i>Lgals3</i>	2,45	5,46	0,00001
<i>H2-Ab1</i>	2,42	5,36	0,00001
<i>Hba-a2; Hba-a1</i>	2,42	5,35	0,00130
<i>Crip1</i>	2,41	5,3	0,00000
<i>Lyz1</i>	2,40	5,29	0,00000
<i>Bola2</i>	2,39	5,25	0,00000
<i>Fam20c</i>	2,37	5,18	0,00000
<i>Fn1</i>	2,37	5,16	0,00260
<i>Tnfsf9</i>	2,36	5,14	0,00001
<i>Osbpl8</i>	2,36	5,13	0,00000



## ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Aldoa</i>	2,35	5,11	0,00001
<i>C3</i>	2,35	5,09	0,00000
<i>Vegfa</i>	2,33	5,04	0,00003
<i>Pgam1</i>	2,32	5	0,00004
<i>Rap2b</i>	2,32	4,98	0,00001
<i>Tank</i>	2,30	4,94	0,00002
<i>Atox1</i>	2,30	4,94	0,00002
<i>Slc16a3</i>	2,30	4,91	0,00001
<i>Pianp</i>	2,29	4,9	0,00000
<i>Crif2</i>	2,29	4,89	0,00000
<i>Zbp1</i>	2,29	4,88	0,00004
<i>Syng1</i>	2,29	4,88	0,00000
<i>Cd68</i>	2,28	4,86	0,00000
<i>Hba-a1; Hba-a2</i>	2,28	4,85	0,00170
<i>Stat1</i>	2,28	4,84	0,00002
<i>Il2rg</i>	2,26	4,79	0,00004
<i>Acaca</i>	2,26	4,78	0,00000
<i>Tspo</i>	2,26	4,78	0,00000
<i>Cd274</i>	2,26	4,78	0,00080
<i>Hmgn3</i>	2,25	4,76	0,00010
<i>Phf11d; Phf11c</i>	2,25	4,75	0,00000
<i>Slamf9</i>	2,24	4,74	0,00001
<i>Dcstamp</i>	2,24	4,73	0,00000
<i>Lmna</i>	2,23	4,7	0,00110
<i>Apobec1</i>	2,23	4,7	0,00000
<i>Npc2</i>	2,23	4,69	0,00000
<i>Phf11b</i>	2,23	4,69	0,00000
<i>Txnrd1</i>	2,21	4,64	0,00120
<i>Arrdc4</i>	2,21	4,63	0,00000
<i>Akap1</i>	2,21	4,62	0,00020
<i>Eno1; Eno1b</i>	2,20	4,61	0,00000
<i>Gfap</i>	2,20	4,61	0,00005
<i>Coro1c</i>	2,20	4,59	0,00002
<i>Gm4070; Gvin1; Gm17757; Gm18853</i>	2,20	4,59	0,00001
<i>Gm20721</i>	2,19	4,55	0,00007
<i>Tgtp2</i>	2,18	4,53	0,00000
<i>Ndufv3</i>	2,18	4,53	0,00002
<i>Sod2</i>	2,18	4,52	0,00000
<i>Shisa5</i>	2,17	4,51	0,00001
<i>Cd99</i>	2,17	4,51	0,00040
<i>Pydc4</i>	2,17	4,49	0,00002



ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Cxcl16</i>	2,17	4,49	0,00000
<i>Gvin1</i>	2,16	4,47	0,00000
<i>Gm4951</i>	2,15	4,45	0,00001
<i>Asb10</i>	2,15	4,43	0,00000
<i>Ube216</i>	2,14	4,42	0,00000
<i>Sdf4</i>	2,14	4,41	0,00000
<i>Cytip</i>	2,13	4,39	0,00003
<i>Olr1</i>	2,13	4,39	0,00060
<i>Nexn</i>	2,13	4,38	0,00008
<i>Psmg4</i>	2,13	4,38	0,00001
<i>Ctsz</i>	2,12	4,36	0,00000
<i>Ssr4</i>	2,12	4,35	0,00006
<i>Slamf7</i>	2,11	4,33	0,00002
<i>Cp</i>	2,11	4,32	0,00020
<i>Sulf2</i>	2,10	4,29	0,00000
<i>Mrc2</i>	2,10	4,28	0,00001
<i>Mrpl33</i>	2,07	4,21	0,00005
<i>Cacna1a</i>	2,07	4,21	0,00001
<i>Cdk1</i>	2,07	4,2	0,00000
<i>Serpine1</i>	2,07	4,19	0,00002
<i>Plp2</i>	2,06	4,18	0,00003
<i>Gnptab</i>	2,06	4,18	0,00000
<i>Gimp</i>	2,05	4,15	0,00020
<i>Trpm1</i>	2,04	4,11	0,00010
<i>Hacd2</i>	2,04	4,1	0,00000
<i>AF529169</i>	2,03	4,08	0,00010
<i>Tmem256</i>	2,02	4,06	0,00001
<i>Soat1</i>	2,01	4,02	0,00001
<i>Chst11</i>	2,00	3,99	0,00010
<i>Prelid2</i>	2,00	3,99	0,00002
<i>Tspan17</i>	1,99	3,97	0,00001
<i>Rab20</i>	1,97	3,91	0,00001
<i>Tpd52</i>	1,96	3,9	0,00000
<i>Serp1</i>	1,96	3,89	0,00020
<i>Dhx58</i>	1,96	3,89	0,00004
<i>Man2b2</i>	1,95	3,86	0,00090
<i>Sgcb</i>	1,95	3,86	0,00005
<i>Cadm1</i>	1,94	3,85	0,00000
<i>Flt1</i>	1,94	3,84	0,00030
<i>Maged1</i>	1,94	3,84	0,00008
<i>F3</i>	1,93	3,8	0,00009



## ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Hscb</i>	1,93	3,8	0,00001
<i>Tmem163</i>	1,92	3,78	0,00010
<i>Galns</i>	1,92	3,78	0,00006
<i>St6gal1</i>	1,92	3,78	0,00002
<i>Trappc2l</i>	1,91	3,75	0,00001
<i>Igbp1</i>	1,91	3,75	0,00006
<i>Dnase1l1</i>	1,89	3,71	0,00002
<i>Psat1</i>	1,89	3,71	0,00020
<i>Rpl12; Snora65</i>	1,89	3,7	0,00002
<i>Rragd</i>	1,89	3,7	0,00000
<i>Cd72</i>	1,87	3,65	0,00040
<i>Hexa</i>	1,86	3,64	0,00001
<i>sep-11</i>	1,86	3,62	0,00110
<i>Use1</i>	1,86	3,62	0,00100
<i>Atp5k</i>	1,85	3,61	0,00010
<i>B4galnt1</i>	1,84	3,59	0,00010
<i>Gm12185; Tgtp1</i>	1,84	3,59	0,00010
<i>Klrb1b</i>	1,83	3,56	0,00000
<i>H2-Q2</i>	1,83	3,56	0,00009
<i>Itgad</i>	1,83	3,55	0,00040
<i>H2-T22; H2-T9</i>	1,82	3,54	0,00005
<i>Mt1</i>	1,82	3,53	0,00001
<i>H2-K1</i>	1,82	3,53	0,00000
<i>Tagln2</i>	1,82	3,52	0,00070
<i>Myo5a</i>	1,81	3,51	0,00001
<i>Gm9396</i>	1,81	3,5	0,00001
<i>Rab11fip1</i>	1,81	3,5	0,00007
<i>BC094916</i>	1,79	3,45	0,00003
<i>Ergic3</i>	1,79	3,45	0,00020
<i>Ldlrad3</i>	1,78	3,44	0,00110
<i>Nr4a3</i>	1,78	3,44	0,00030
<i>Gm38425; Gab3</i>	1,77	3,42	0,00008
<i>Megf9</i>	1,77	3,41	0,00001
<i>H2-T23</i>	1,77	3,41	0,00002
<i>Sh3bgrl</i>	1,77	3,4	0,00001
<i>Nrp1; Mir1903</i>	1,76	3,39	0,00000
<i>Scimp</i>	1,76	3,39	0,00001
<i>D16Ert472e</i>	1,76	3,39	0,00010
<i>Mthfs</i>	1,76	3,38	0,00008
<i>Pde4b</i>	1,75	3,37	0,00010
<i>Vkorc1</i>	1,75	3,37	0,00006





ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Uap111</i>	1,73	3,32	0,00000
<i>Lgals1</i>	1,73	3,32	0,00200
<i>Atg7</i>	1,73	3,31	0,00250
<i>Sik1</i>	1,73	3,31	0,00020
<i>Bbs10</i>	1,72	3,29	0,00020
<i>Gaa</i>	1,72	3,29	0,00050
<i>Fbxw4</i>	1,72	3,29	0,00001
<i>Pqlc3</i>	1,71	3,28	0,00004
<i>H2-M3</i>	1,71	3,28	0,00009
<i>Trim25</i>	1,70	3,26	0,00000
<i>Trem2</i>	1,70	3,26	0,00000
<i>Sptbn1</i>	1,70	3,25	0,00020
<i>Bcl2a1c</i>	1,70	3,24	0,00010
<i>Ctsl</i>	1,70	3,24	0,00000
<i>Helz2</i>	1,69	3,23	0,00002
<i>Irf7</i>	1,69	3,23	0,00030
<i>Fundc2</i>	1,69	3,23	0,00003
<i>Myeov2</i>	1,68	3,21	0,00003
<i>Cox6a1</i>	1,68	3,21	0,00040
<i>Cyp51</i>	1,68	3,2	0,00002
<i>Pea15a</i>	1,67	3,19	0,00010
<i>Calm3</i>	1,67	3,18	0,00020
<i>Iqgap1</i>	1,67	3,18	0,00003
<i>Cd9</i>	1,66	3,17	0,00000
<i>Rplp2; Snora52</i>	1,66	3,17	0,00030
<i>Rpl23</i>	1,66	3,17	0,00002
<i>Lipa</i>	1,66	3,16	0,00002
<i>Gm4955</i>	1,66	3,15	0,00006
<i>Smim14</i>	1,66	3,15	0,00002
<i>Malt1</i>	1,65	3,14	0,00004
<i>Mapkapk2</i>	1,65	3,13	0,00002
<i>Bsg</i>	1,65	3,13	0,00002
<i>Adap1</i>	1,64	3,12	0,00006
<i>Ggct</i>	1,64	3,12	0,00001
<i>Slc7a11</i>	1,64	3,11	0,00001
<i>Dtnbp1</i>	1,64	3,11	0,00050
<i>1500011K16Rik</i>	1,63	3,09	0,00020
<i>Ndufb2</i>	1,63	3,09	0,00020
<i>Timp2</i>	1,63	3,09	0,00007
<i>Cd34</i>	1,62	3,08	0,00001
<i>Hilpda</i>	1,62	3,08	0,00020



## ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Anxa4</i>	1,62	3,08	0,00010
<i>Creg1</i>	1,62	3,07	0,00004
<i>Cd5</i>	1,61	3,06	0,00006
<i>Gca</i>	1,61	3,05	0,00009
<i>Atp6v1b2</i>	1,61	3,05	0,00150
<i>Lsm4</i>	1,61	3,05	0,00003
<i>Abi3bp</i>	1,60	3,04	0,00002
<i>Pgm2</i>	1,60	3,03	0,00005
<i>Pvr</i>	1,60	3,03	0,00030
<i>Ctsb</i>	1,60	3,03	0,00000
<i>Fdps</i>	1,59	3,02	0,00001
<i>Hint1</i>	1,59	3,02	0,00001
<i>Maff</i>	1,59	3,02	0,00008
<i>Pydc3</i>	1,59	3,01	0,00040
<i>Cd48</i>	1,58	3	0,00020
<i>Atp6v0d2</i>	1,58	3	0,00200
<i>Ptprg</i>	1,58	3	0,00280
<i>Cpeb1</i>	1,58	2,99	0,00001
<i>Enpp1</i>	1,58	2,99	0,00050
<i>Prelid1</i>	1,58	2,99	0,00020
<i>Xylt1</i>	1,58	2,98	0,00003
<i>Psmb8</i>	1,58	2,98	0,00004
<i>Rps10</i>	1,58	2,98	0,00030
<i>Swi5</i>	1,57	2,96	0,00040
<i>Acer3</i>	1,57	2,96	0,00070
<i>Msmo1</i>	1,57	2,96	0,00006
<i>Gnb2l1; Snord96a; Snord95</i>	1,57	2,96	0,00030
<i>Pmp22</i>	1,57	2,96	0,00000
<i>Tceb2</i>	1,57	2,96	0,00080
<i>Atp6v0e</i>	1,56	2,95	0,00004
<i>Cers6</i>	1,56	2,94	0,00020
<i>Gm7226</i>	1,56	2,94	0,00030
<i>Hcst</i>	1,55	2,93	0,00030
<i>Sowahc</i>	1,55	2,92	0,00030
<i>Nap1l1</i>	1,55	2,92	0,00000
<i>Plekhh2</i>	1,55	2,92	0,00002
<i>Cdk18</i>	1,54	2,91	0,00000
<i>Gpr84</i>	1,54	2,91	0,00010
<i>Nrp2</i>	1,54	2,9	0,00120
<i>Eef1b2</i>	1,54	2,9	0,00020
<i>Gsto1</i>	1,54	2,9	0,00007



## ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Csf2ra</i>	1,54	2,9	0,00090
<i>Mthfs1</i>	1,53	2,89	0,00003
<i>S100a1</i>	1,53	2,88	0,00090
<i>Tpm4</i>	1,53	2,88	0,00010
<i>Cstb</i>	1,52	2,87	0,00000
<i>Ddhd1; Mir5131</i>	1,52	2,87	0,00003
<i>Pdcd1</i>	1,52	2,86	0,00260
<i>Hdac9</i>	1,51	2,85	0,00260
<i>Eif4b</i>	1,51	2,85	0,00060
<i>Tmem189</i>	1,51	2,84	0,00004
<i>Clec1b</i>	1,51	2,84	0,00002
<i>Eif3k</i>	1,51	2,84	0,00020
<i>Gpi1</i>	1,51	2,84	0,00000
<i>Siva1</i>	1,51	2,84	0,00000
<i>Rpl36a1</i>	1,51	2,84	0,00010
<i>Il1r11</i>	1,50	2,83	0,00100
<i>Usp30</i>	1,50	2,83	0,00005
<i>Med29</i>	1,50	2,83	0,00150
<i>Galc</i>	1,50	2,83	0,00030
<i>Abhd12</i>	1,49	2,81	0,00180
<i>H2-Ob</i>	1,49	2,81	0,00008
<i>Nenf</i>	1,49	2,8	0,00002
<i>Tyrbp</i>	1,49	2,8	0,00002
<i>H2-Aa</i>	1,48	2,79	0,00030
<i>Arhgap26</i>	1,48	2,79	0,00004
<i>Oasl2</i>	1,48	2,78	0,00010
<i>Fkbp2</i>	1,48	2,78	0,00007
<i>Fblim1</i>	1,47	2,77	0,00210
<i>Med28</i>	1,47	2,77	0,00050
<i>GltP</i>	1,47	2,77	0,00030
<i>Aldh2</i>	1,46	2,75	0,00020
<i>Mapkapk3</i>	1,46	2,75	0,00070
<i>St3gal1</i>	1,46	2,75	0,00005
<i>AW112010</i>	1,46	2,75	0,00002
<i>Lsp1</i>	1,45	2,74	0,00004
<i>Apoc2; Apoc4</i>	1,45	2,74	0,00008
<i>Arpp19</i>	1,45	2,74	0,00090
<i>Ngfrap1</i>	1,45	2,74	0,00003
<i>Sgms1</i>	1,45	2,74	0,00150
<i>Nod2</i>	1,45	2,73	0,00040
<i>Tmem242</i>	1,45	2,73	0,00260



## ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Xdh</i>	1,45	2,73	0,00070
<i>Prdx6</i>	1,44	2,72	0,00010
<i>Clec2d</i>	1,44	2,72	0,00110
<i>Pld3</i>	1,44	2,72	0,00007
<i>Cox7a2l</i>	1,44	2,72	0,00030
<i>Pmvk</i>	1,44	2,71	0,00020
<i>Arhgap24</i>	1,44	2,71	0,00002
<i>Degs1</i>	1,43	2,7	0,00200
<i>Tmem176a</i>	1,43	2,7	0,00050
<i>Selm</i>	1,43	2,7	0,00002
<i>Mrpl52</i>	1,43	2,7	0,00030
<i>Lat2</i>	1,43	2,69	0,00010
<i>Timm13</i>	1,43	2,69	0,00170
<i>Cacnb4</i>	1,42	2,68	0,00020
<i>Ndufb5</i>	1,42	2,67	0,00020
<i>BC028528</i>	1,42	2,67	0,00004
<i>Chmp4b</i>	1,41	2,66	0,00060
<i>Gba</i>	1,41	2,66	0,00030
<i>Syt11</i>	1,41	2,66	0,00100
<i>Ctsd; Ifitm10</i>	1,41	2,66	0,00004
<i>Vps13c</i>	1,41	2,66	0,00020
<i>Uqcr11</i>	1,41	2,66	0,00007
<i>Gm2a</i>	1,41	2,66	0,00020
<i>Ifi27</i>	1,41	2,66	0,00170
<i>Efr3b</i>	1,41	2,66	0,00007
<i>Polr2f</i>	1,41	2,66	0,00010
<i>Rpl10a</i>	1,41	2,66	0,00004
<i>Ppt1</i>	1,41	2,65	0,00009
<i>Zfand2a</i>	1,41	2,65	0,00008
<i>Trim30a</i>	1,41	2,65	0,00010
<i>Hmgcr</i>	1,41	2,65	0,00070
<i>Rpl11</i>	1,40	2,64	0,00040
<i>Mt2</i>	1,40	2,64	0,00060
<i>Dynlt3</i>	1,40	2,64	0,00009
<i>Lox</i>	1,40	2,64	0,00008
<i>Dbi</i>	1,40	2,63	0,00150
<i>Isg15</i>	1,40	2,63	0,00003
<i>Tomm7</i>	1,40	2,63	0,00002
<i>Arap2</i>	1,40	2,63	0,00040
<i>Plbd2</i>	1,40	2,63	0,00230
<i>Rps5</i>	1,39	2,62	0,00001



ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Cox7a2</i>	1,39	2,62	0,00005
<i>Fam162a</i>	1,39	2,62	0,00040
<i>Bag1</i>	1,38	2,61	0,00150
<i>Insig1</i>	1,38	2,61	0,00060
<i>Ap2s1</i>	1,38	2,61	0,00120
<i>Hist1h1c</i>	1,38	2,61	0,00060
<i>Il3ra</i>	1,38	2,61	0,00080
<i>Rwdd1</i>	1,38	2,6	0,00004
<i>Scpep1</i>	1,38	2,6	0,00040
<i>Fuca1</i>	1,37	2,59	0,00002
<i>Cox6b1</i>	1,37	2,59	0,00050
<i>Myh10</i>	1,37	2,59	0,00100
<i>Uqcr10</i>	1,37	2,59	0,00060
<i>Gm11808</i>	1,37	2,58	0,00001
<i>Sc5d</i>	1,37	2,58	0,00003
<i>Crtap</i>	1,37	2,58	0,00170
<i>Psme1</i>	1,37	2,58	0,00003
<i>Trem12</i>	1,37	2,58	0,00004
<i>Rbms1</i>	1,36	2,57	0,00007
<i>Cops6</i>	1,36	2,57	0,00090
<i>Atp6v1f</i>	1,36	2,57	0,00010
<i>Os9</i>	1,36	2,57	0,00010
<i>Rpl22</i>	1,36	2,56	0,00010
<i>Rell1</i>	1,36	2,56	0,00008
<i>Oas2</i>	1,36	2,56	0,00030
<i>Tmsb10</i>	1,36	2,56	0,00010
<i>Trem1</i>	1,36	2,56	0,00003
<i>Optn</i>	1,35	2,55	0,00280
<i>Atp5e</i>	1,35	2,55	0,00030
<i>Fam219a</i>	1,35	2,55	0,00190
<i>Amdhd2</i>	1,35	2,55	0,00001
<i>Adora1</i>	1,34	2,54	0,00010
<i>Gyg</i>	1,34	2,54	0,00040
<i>Svbp</i>	1,34	2,54	0,00070
<i>Cd83</i>	1,34	2,54	0,00030
<i>Mgst3</i>	1,34	2,53	0,00110
<i>Errfi1</i>	1,34	2,53	0,00190
<i>Cd244</i>	1,33	2,52	0,00020
<i>Gm10118</i>	1,33	2,52	0,00150
<i>Dstn</i>	1,33	2,51	0,00070
<i>Epb41l3</i>	1,33	2,51	0,00110



## ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Akr7a5</i>	1,32	2,5	0,00030
<i>Txn1</i>	1,32	2,5	0,00001
<i>Ndufb7</i>	1,32	2,5	0,00090
<i>Cpq</i>	1,32	2,5	0,00006
<i>Eif3h</i>	1,32	2,5	0,00040
<i>Naglu</i>	1,32	2,49	0,00005
<i>Rassf3</i>	1,31	2,48	0,00020
<i>Txndc17</i>	1,31	2,48	0,00010
<i>C920025E04Rik</i>	1,31	2,48	0,00003
<i>Tmem219</i>	1,30	2,47	0,00020
<i>Atp6v1c1</i>	1,30	2,47	0,00030
<i>Slc43a3</i>	1,30	2,46	0,00190
<i>Zc3h12a</i>	1,30	2,46	0,00080
<i>Tmem208</i>	1,30	2,46	0,00070
<i>Smpdl3a</i>	1,30	2,46	0,00010
<i>Rpl24; Zbtb11</i>	1,30	2,46	0,00001
<i>Psmb9</i>	1,30	2,46	0,00010
<i>Lrrc8b</i>	1,29	2,45	0,00040
<i>Ogfr</i>	1,29	2,44	0,00040
<i>Prdx1</i>	1,29	2,44	0,00070
<i>Mien1</i>	1,29	2,44	0,00001
<i>2010107E04Rik</i>	1,29	2,44	0,00006
<i>Eno1b</i>	1,29	2,44	0,00008
<i>Rpl36a</i>	1,28	2,43	0,00004
<i>Akr1a1</i>	1,28	2,42	0,00070
<i>Lrmp</i>	1,28	2,42	0,00007
<i>Rp9</i>	1,28	2,42	0,00160
<i>Srgn</i>	1,28	2,42	0,00003
<i>Smim4</i>	1,28	2,42	0,00008
<i>Rpl32</i>	1,27	2,41	0,00001
<i>2210013021Rik</i>	1,27	2,41	0,00050
<i>Rpl39</i>	1,27	2,41	0,00001
<i>Rps15</i>	1,27	2,41	0,00030
<i>Ndufa2</i>	1,27	2,41	0,00010
<i>Tmem9</i>	1,26	2,4	0,00280
<i>Fcgr2b</i>	1,26	2,4	0,00020
<i>Nop10</i>	1,26	2,4	0,00006
<i>Ptpmt1</i>	1,26	2,4	0,00020
<i>Rhbdf2</i>	1,26	2,4	0,00150
<i>Rcbtb2</i>	1,26	2,4	0,00090
<i>Thbs1</i>	1,26	2,39	0,00020



ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Ufm1</i>	1,25	2,38	0,00260
<i>Rpl9</i>	1,25	2,38	0,00003
<i>Tmed3</i>	1,25	2,38	0,00020
<i>Grcc10</i>	1,24	2,37	0,00020
<i>Cyth1</i>	1,24	2,37	0,00030
<i>Nme2</i>	1,24	2,37	0,00009
<i>Hyi</i>	1,24	2,36	0,00210
<i>Snrpd2</i>	1,24	2,36	0,00040
<i>Ndufc1</i>	1,23	2,35	0,00040
<i>Slc44a1</i>	1,23	2,35	0,00010
<i>Gm9844</i>	1,23	2,35	0,00002
<i>Eif2ak2</i>	1,23	2,35	0,00230
<i>Banf1</i>	1,23	2,35	0,00009
<i>Atp6v1g1</i>	1,23	2,34	0,00070
<i>Fbxo6</i>	1,23	2,34	0,00220
<i>Dync1li1</i>	1,23	2,34	0,00030
<i>Mir23b; Mir27b; Mir24-1; 2010111101Rik</i>	1,23	2,34	0,00003
<i>Ift22</i>	1,22	2,33	0,00140
<i>H2aff</i>	1,22	2,33	0,00030
<i>Hint3</i>	1,22	2,33	0,00040
<i>Csnk2b</i>	1,22	2,33	0,00030
<i>Guca1a</i>	1,22	2,33	0,00040
<i>Akt3</i>	1,21	2,32	0,00120
<i>1810011010Rik</i>	1,21	2,32	0,00100
<i>Lrrtm3</i>	1,21	2,32	0,00040
<i>Pick1</i>	1,21	2,32	0,00005
<i>Srebfb2</i>	1,21	2,32	0,00002
<i>Gm8909</i>	1,21	2,32	0,00050
<i>Socs6</i>	1,21	2,32	0,00280
<i>Dpp7</i>	1,21	2,31	0,00050
<i>Arpc1b</i>	1,21	2,31	0,00030
<i>Tmem123</i>	1,21	2,31	0,00040
<i>Ccl3</i>	1,21	2,31	0,00150
<i>Gm3839</i>	1,21	2,31	0,00001
<i>2700060E02Rik</i>	1,21	2,31	0,00020
<i>H2-Q8; H2-Q6</i>	1,21	2,31	0,00040
<i>Rbpj</i>	1,20	2,3	0,00140
<i>2700029M09Rik</i>	1,20	2,3	0,00080
<i>Cyba</i>	1,20	2,3	0,00050
<i>Tomm6; Prickle4</i>	1,20	2,3	0,00020
<i>Hsd17b7</i>	1,20	2,29	0,00120





## ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Bcl2a1d</i>	1,20	2,29	0,00020
<i>H2-Q5</i>	1,20	2,29	0,00050
<i>Bcl2</i>	1,19	2,28	0,00190
<i>Aurkaip1</i>	1,19	2,28	0,00030
<i>Tbc1d1</i>	1,19	2,28	0,00030
<i>Fzd7</i>	1,18	2,27	0,00080
<i>Rps15a</i>	1,18	2,27	0,00006
<i>Cmc1</i>	1,18	2,27	0,00050
<i>Kcnj2</i>	1,18	2,27	0,00060
<i>H2-Q7; H2-Q9</i>	1,18	2,27	0,00008
<i>Ifih1</i>	1,18	2,26	0,00020
<i>Mrpl20</i>	1,18	2,26	0,00010
<i>Chst2</i>	1,18	2,26	0,00100
<i>Tctex1d2</i>	1,18	2,26	0,00030
<i>Mpeg1</i>	1,18	2,26	0,00005
<i>Uqcc3</i>	1,18	2,26	0,00090
<i>Ildr2</i>	1,17	2,25	0,00060
<i>Siglecf</i>	1,17	2,25	0,00040
<i>Ropn11</i>	1,17	2,25	0,00050
<i>Tmem258</i>	1,17	2,25	0,00020
<i>Gpd2</i>	1,16	2,24	0,00005
<i>Znfx1</i>	1,16	2,24	0,00290
<i>Cd180</i>	1,16	2,24	0,00080
<i>Dhrs1</i>	1,16	2,24	0,00280
<i>Gtf2h5</i>	1,16	2,23	0,00004
<i>Dusp5</i>	1,16	2,23	0,00270
<i>Uck2</i>	1,15	2,22	0,00040
<i>Eif3f</i>	1,15	2,22	0,00050
<i>Gas2l3</i>	1,15	2,22	0,00020
<i>Sdf2</i>	1,15	2,22	0,00120
<i>Ccl4</i>	1,15	2,22	0,00030
<i>Atxn10</i>	1,15	2,22	0,00020
<i>Rps28</i>	1,15	2,22	0,00005
<i>Slc1a5</i>	1,14	2,21	0,00140
<i>Arhgef7</i>	1,14	2,21	0,00140
<i>Ubl5</i>	1,14	2,21	0,00010
<i>Bcl2a1a</i>	1,14	2,21	0,00120
<i>Cnpy2</i>	1,14	2,21	0,00020
<i>2700094K13Rik</i>	1,14	2,2	0,00030
<i>Dpm3</i>	1,14	2,2	0,00170
<i>Pet100</i>	1,14	2,2	0,00130



ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Kxd1</i>	1,14	2,2	0,00010
<i>Higd1a</i>	1,14	2,2	0,00010
<i>Arl5c</i>	1,13	2,19	0,00030
<i>Gm5069</i>	1,12	2,18	0,00240
<i>Sri</i>	1,12	2,18	0,00270
<i>Hprt</i>	1,12	2,18	0,00200
<i>Rpl32l</i>	1,12	2,18	0,00160
<i>1700047117Rik2; Fam177a</i>	1,12	2,18	0,00010
<i>Churc1</i>	1,12	2,18	0,00190
<i>Rpl29</i>	1,12	2,17	0,00020
<i>Gm5848</i>	1,12	2,17	0,00080
<i>Gm13841; Rpl29</i>	1,12	2,17	0,00020
<i>L1cam</i>	1,12	2,17	0,00006
<i>Rpl38</i>	1,12	2,17	0,00005
<i>Snape1</i>	1,12	2,17	0,00009
<i>Eif3m</i>	1,11	2,16	0,00030
<i>Slc24a1</i>	1,11	2,16	0,00020
<i>Rnf144b</i>	1,11	2,16	0,00080
<i>Rps13</i>	1,10	2,15	0,00080
<i>Rps27l</i>	1,10	2,15	0,00007
<i>Mfsd12</i>	1,10	2,15	0,00010
<i>Bloc1s1</i>	1,10	2,15	0,00050
<i>Plekhb2</i>	1,10	2,14	0,00050
<i>Serf2</i>	1,10	2,14	0,00030
<i>Zc2hc1a</i>	1,10	2,14	0,00030
<i>Penk</i>	1,10	2,14	0,00200
<i>Ldha</i>	1,10	2,14	0,00003
<i>Pigs</i>	1,10	2,14	0,00020
<i>Tbca</i>	1,10	2,14	0,00040
<i>Sdf2l1</i>	1,10	2,14	0,00020
<i>Suclg1</i>	1,09	2,13	0,00240
<i>Taf10</i>	1,09	2,13	0,00050
<i>Aprt</i>	1,09	2,13	0,00210
<i>Dap</i>	1,09	2,13	0,00070
<i>2410015M20Rik</i>	1,09	2,13	0,00040
<i>Ctsa</i>	1,08	2,12	0,00160
<i>Mki67</i>	1,08	2,12	0,00120
<i>Gpx4</i>	1,08	2,12	0,00030
<i>Slc35e4</i>	1,08	2,12	0,00010
<i>Borcs7</i>	1,08	2,12	0,00130
<i>Edf1</i>	1,08	2,11	0,00130



## ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Gde1</i>	1,08	2,11	0,00100
<i>Tpbg</i>	1,08	2,11	0,00140
<i>Fem1b</i>	1,08	2,11	0,00130
<i>Peli2</i>	1,08	2,11	0,00050
<i>Tbc1d4</i>	1,08	2,11	0,00070
<i>Colec12</i>	1,08	2,11	0,00010
<i>Mbd2</i>	1,08	2,11	0,00220
<i>Rxrg</i>	1,07	2,1	0,00050
<i>Tnfsf8</i>	1,07	2,1	0,00020
<i>Paox</i>	1,07	2,1	0,00150
<i>Tnfsf13b</i>	1,07	2,1	0,00250
<i>Eif4ebp1</i>	1,07	2,1	0,00030
<i>Plet1</i>	1,07	2,1	0,00030
<i>Stat2</i>	1,07	2,1	0,00080
<i>Erlec1</i>	1,07	2,1	0,00110
<i>Nt5c</i>	1,07	2,1	0,00080
<i>Cxcl14</i>	1,07	2,1	0,00030
<i>Fau</i>	1,07	2,1	0,00150
<i>Dpcd</i>	1,07	2,1	0,00010
<i>Atp10a</i>	1,06	2,09	0,00130
<i>Cmtm3</i>	1,06	2,09	0,00150
<i>Cyp4f18</i>	1,06	2,09	0,00020
<i>Nudt14</i>	1,06	2,09	0,00010
<i>Rpl18</i>	1,06	2,08	0,00070
<i>Gm10094; Sap18; Mir3077</i>	1,06	2,08	0,00140
<i>Rplp0</i>	1,05	2,07	0,00110
<i>2610524H06Rik</i>	1,05	2,07	0,00004
<i>Plxna2</i>	1,04	2,06	0,00260
<i>Fxyd6</i>	1,04	2,06	0,00020
<i>Acot9</i>	1,04	2,06	0,00300
<i>Atp5j</i>	1,04	2,06	0,00050
<i>Prkg1</i>	1,04	2,06	0,00040
<i>Coa5</i>	1,04	2,05	0,00040
<i>Mrps21</i>	1,04	2,05	0,00260
<i>LOC100862223</i>	1,04	2,05	0,00040
<i>Surf1</i>	1,03	2,04	0,00090
<i>Mospd2</i>	1,03	2,04	0,00140
<i>Iigp1</i>	1,03	2,04	0,00020
<i>Slc2a6</i>	1,02	2,03	0,00070
<i>Zbtb8os</i>	1,02	2,03	0,00090
<i>Parp12</i>	1,02	2,03	0,00090



ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Lamp1</i>	1,02	2,03	0,00006
<i>C4b</i>	1,02	2,03	0,00290
<i>BC004004</i>	1,01	2,02	0,00100
<i>Snrpe</i>	1,01	2,01	0,00005
<i>Mrps28</i>	1,01	2,01	0,00230
<i>Aimp1</i>	1,01	2,01	0,00130
<i>Ost4</i>	1,01	2,01	0,00060
<i>Ppib</i>	1,01	2,01	0,00030
<i>Fkbp1b</i>	1,01	2,01	0,00130
<i>Ifnar2</i>	1,01	2,01	0,00010
<i>Bambi</i>	1,01	2,01	0,00280
<i>March5</i>	1,01	2,01	0,00080
<i>Rps19</i>	1,00	2	0,00030
<i>Anapc13</i>	1,00	2	0,00130
<i>Rpl27</i>	1,00	2	0,00020
<i>Pfdn5</i>	1,00	2	0,00110
<i>Eef1g</i>	1,00	2	0,00030
<i>Fam174a</i>	0,99	1,99	0,00240
<i>Noct</i>	0,99	1,99	0,00230
<i>Gng5</i>	0,99	1,99	0,00030
<i>Tlr1</i>	0,99	1,99	0,00080
<i>Guk1</i>	0,99	1,99	0,00180
<i>Nt5c3b</i>	0,99	1,99	0,00120
<i>Hist1h2bc</i>	0,99	1,99	0,00030
<i>Tsc22d1</i>	0,99	1,99	0,00070
<i>Psm1</i>	0,99	1,99	0,00160
<i>Ifit3</i>	0,99	1,99	0,00260
<i>Hectd2</i>	0,99	1,99	0,00030
<i>Smyd2</i>	0,99	1,98	0,00080
<i>Srp14</i>	0,99	1,98	0,00100
<i>Shfm1</i>	0,99	1,98	0,00010
<i>Fam214a</i>	0,99	1,98	0,00230
<i>Ctdnep1</i>	0,99	1,98	0,00090
<i>Isg20</i>	0,98	1,97	0,00150
<i>Rpl19</i>	0,98	1,97	0,00020
<i>Naaa</i>	0,97	1,96	0,00200
<i>Rpl14; Rpl14-ps1</i>	0,97	1,96	0,00030
<i>Tln2</i>	0,97	1,96	0,00120
<i>Gm8290</i>	0,97	1,96	0,00190
<i>Ccl12</i>	0,97	1,96	0,00280
<i>Cisd3</i>	0,97	1,96	0,00180



## ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Slc11a1</i>	0,96	1,95	0,00170
<i>Hsd17b12</i>	0,96	1,95	0,00050
<i>Clint1</i>	0,96	1,95	0,00080
<i>Nol12</i>	0,96	1,95	0,00250
<i>Stk19</i>	0,96	1,95	0,00010
<i>Tmbim4</i>	0,96	1,94	0,00030
<i>Ebpl</i>	0,96	1,94	0,00070
<i>Lrrfip1</i>	0,95	1,93	0,00270
<i>Cd84</i>	0,95	1,93	0,00020
<i>Cox4i1</i>	0,95	1,93	0,00110
<i>Phax</i>	0,95	1,93	0,00160
<i>Rpl13; Snord68; Mir7079</i>	0,94	1,92	0,00080
<i>Cox5b</i>	0,94	1,92	0,00020
<i>Rpl34; Rpl34-ps1</i>	0,93	1,91	0,00060
<i>Htatip2</i>	0,93	1,91	0,00030
<i>Rnf213</i>	0,93	1,91	0,00230
<i>Cetn4</i>	0,93	1,9	0,00150
<i>Mif4gd</i>	0,93	1,9	0,00130
<i>Snap29</i>	0,93	1,9	0,00070
<i>Ccdc86</i>	0,93	1,9	0,00160
<i>Ms4a7</i>	0,93	1,9	0,00190
<i>Fmn1</i>	0,92	1,89	0,00110
<i>Hacd4</i>	0,92	1,89	0,00110
<i>Gm10094</i>	0,92	1,89	0,00120
<i>Hsd17b10</i>	0,92	1,89	0,00190
<i>Rps26</i>	0,92	1,89	0,00150
<i>Slirp</i>	0,92	1,89	0,00020
<i>Krtcap2</i>	0,91	1,88	0,00230
<i>Adam9</i>	0,91	1,88	0,00180
<i>Gpx1</i>	0,91	1,88	0,00240
<i>Nme1</i>	0,91	1,88	0,00100
<i>Marveld1</i>	0,91	1,88	0,00150
<i>Adipor1</i>	0,90	1,87	0,00220
<i>Mrpl27</i>	0,90	1,87	0,00020
<i>Atp5g2</i>	0,90	1,87	0,00180
<i>Txnrd2</i>	0,90	1,87	0,00150
<i>Pla2g16</i>	0,90	1,87	0,00100
<i>Usmg5</i>	0,90	1,87	0,00190
<i>Lamc1</i>	0,90	1,86	0,00200
<i>Fcer1g</i>	0,90	1,86	0,00240
<i>B2m</i>	0,90	1,86	0,00040



ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>S100a13</i>	0,90	1,86	0,00140
<i>Rpl6</i>	0,90	1,86	0,00030
<i>Rps11</i>	0,90	1,86	0,00020
<i>Olfm4</i>	0,90	1,86	0,00170
<i>Rps21</i>	0,89	1,85	0,00220
<i>Dgkz</i>	0,89	1,85	0,00120
<i>Cep41</i>	0,89	1,85	0,00110
<i>Ndufa13</i>	0,89	1,85	0,00050
<i>LOC102641600; Gm11273</i>	0,89	1,85	0,00100
<i>Clybl</i>	0,89	1,85	0,00070
<i>Rpl36</i>	0,89	1,85	0,00100
<i>Gm4832</i>	0,89	1,85	0,00070
<i>Acbd6</i>	0,88	1,84	0,00040
<i>Anp32b</i>	0,88	1,84	0,00290
<i>Cpeb2</i>	0,88	1,84	0,00070
<i>Atp2a1</i>	0,88	1,84	0,00060
<i>Rps27rt</i>	0,88	1,84	0,00010
<i>Fgf13</i>	0,88	1,84	0,00040
<i>Ddx24</i>	0,88	1,84	0,00210
<i>Ddx31</i>	0,87	1,83	0,00060
<i>Rpl21</i>	0,87	1,83	0,00040
<i>Gadd45a</i>	0,87	1,83	0,00070
<i>Slc25a4</i>	0,87	1,83	0,00180
<i>Eif3e</i>	0,87	1,83	0,00030
<i>Tap1</i>	0,87	1,83	0,00110
<i>Speg</i>	0,86	1,82	0,00100
<i>Dhrs3</i>	0,86	1,82	0,00190
<i>Atp5j2</i>	0,86	1,82	0,00150
<i>Coq7</i>	0,86	1,82	0,00160
<i>Got2</i>	0,86	1,82	0,00030
<i>Slc25a3</i>	0,86	1,82	0,00090
<i>Btf3</i>	0,86	1,82	0,00070
<i>Fth1</i>	0,86	1,82	0,00280
<i>Rps27rt; Rps27</i>	0,86	1,81	0,00120
<i>Zfyve21</i>	0,86	1,81	0,00180
<i>Trappc6a</i>	0,85	1,8	0,00170
<i>Uxt</i>	0,85	1,8	0,00240
<i>Cox17</i>	0,85	1,8	0,00050
<i>Slc31a1</i>	0,84	1,79	0,00200
<i>Tma7</i>	0,84	1,79	0,00270
<i>Atp5g1</i>	0,84	1,79	0,00080



## ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Rap2a</i>	0,84	1,79	0,00290
<i>Fdft1</i>	0,84	1,79	0,00080
<i>Rps18</i>	0,84	1,79	0,00030
<i>Ifi44</i>	0,83	1,78	0,00200
<i>Bri3</i>	0,83	1,78	0,00110
<i>Cox7b</i>	0,83	1,78	0,00110
<i>Txndc16</i>	0,83	1,78	0,00080
<i>Eef1d</i>	0,83	1,78	0,00120
<i>Thy1</i>	0,82	1,77	0,00120
<i>Atpif1</i>	0,81	1,75	0,00040
<i>Trim30e-ps1</i>	0,81	1,75	0,00220
<i>Mrgpre</i>	0,81	1,75	0,00110
<i>Tgfb2</i>	0,81	1,75	0,00110
<i>Xaf1</i>	0,81	1,75	0,00260
<i>Psme2</i>	0,81	1,75	0,00040
<i>Mx1</i>	0,81	1,75	0,00200
<i>Stard4</i>	0,81	1,75	0,00210
<i>Phyh</i>	0,80	1,74	0,00240
<i>Rpl5</i>	0,80	1,74	0,00140
<i>Bri3bp</i>	0,80	1,74	0,00090
<i>Rasa4; Mir7035</i>	0,80	1,74	0,00190
<i>Ethe1</i>	0,80	1,74	0,00110
<i>Uba52</i>	0,80	1,74	0,00080
<i>Cd83</i>	0,80	1,74	0,00250
<i>Tmem254b; Tmem254c; Tmem254a</i>	0,80	1,74	0,00280
<i>Trps1; Mir1907</i>	0,80	1,74	0,00260
<i>Zfp704</i>	0,79	1,73	0,00110
<i>Gapdh</i>	0,79	1,73	0,00040
<i>Rpl28</i>	0,79	1,73	0,00200
<i>Tmem254c; Tmem254a</i>	0,79	1,73	0,00160
<i>Pgap1</i>	0,78	1,72	0,00220
<i>Timm8b</i>	0,78	1,72	0,00090
<i>Nsa2</i>	0,78	1,72	0,00030
<i>Abcd2</i>	0,78	1,72	0,00080
<i>Gm20267</i>	0,77	1,71	0,00110
<i>Ctsh</i>	0,77	1,71	0,00190
<i>Atp1b3</i>	0,77	1,71	0,00040
<i>Rpl15</i>	0,77	1,71	0,00050
<i>Gm4581</i>	0,77	1,71	0,00040
<i>Pfdn1</i>	0,77	1,71	0,00200
<i>Tmem254c; Tmem254a</i>	0,77	1,7	0,00190



ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Ugt1a2; Ugt1a6a; Ugt1a6b; Ugt1a10; Ugt1a7c; Ugt1a5; Ugt1a9; Ugt1a1</i>	0,76	1,69	0,00220
<i>Pdzk1ip1</i>	0,76	1,69	0,00240
<i>Gltscr2</i>	0,76	1,69	0,00260
<i>Tpst1</i>	0,75	1,68	0,00230
<i>Cinp</i>	0,75	1,68	0,00040
<i>Anapc11</i>	0,74	1,67	0,00270
<i>Atp5h</i>	0,74	1,67	0,00100
<i>Acot13</i>	0,74	1,67	0,00190
<i>Chchd1</i>	0,74	1,67	0,00130
<i>Abrac1</i>	0,73	1,66	0,00110
<i>Pim3</i>	0,73	1,66	0,00290
<i>Nptn</i>	0,72	1,65	0,00070
<i>Rpl23a; Snord42b</i>	0,72	1,65	0,00090
<i>Ndufs6</i>	0,72	1,65	0,00130
<i>Lrp12</i>	0,72	1,65	0,00080
<i>Fkbp1a</i>	0,71	1,64	0,00240
<i>Fgl2</i>	0,71	1,64	0,00190
<i>Pafah1b3</i>	0,71	1,64	0,00060
<i>Dek</i>	0,71	1,64	0,00120
<i>H2-T10</i>	0,70	1,63	0,00180
<i>Gm14410; Gm14411; Gm14413</i>	0,70	1,62	0,00190
<i>Naa20</i>	0,69	1,61	0,00250
<i>Gm14308</i>	0,69	1,61	0,00210
<i>Tmem147</i>	0,69	1,61	0,00230
<i>Dph5</i>	0,68	1,6	0,00100
<i>Ndufs5</i>	0,67	1,59	0,00120
<i>Spcs1</i>	0,67	1,59	0,00190
<i>Rps20</i>	0,66	1,58	0,00160
<i>Lamp2</i>	0,65	1,57	0,00160
<i>Car13</i>	0,64	1,56	0,00270
<i>Ap1s3</i>	0,62	1,54	0,00140
<i>Samsn1</i>	0,62	1,54	0,00160
<i>Rps4x</i>	0,61	1,53	0,00160
<i>0610007P14Rik</i>	0,58	1,5	0,00230
<i>Cast</i>	0,58	1,5	0,00260
<i>Snrpg</i>	0,58	1,49	0,00250
<i>Cnih1</i>	0,58	1,49	0,00240
<i>Cep78</i>	0,57	1,48	0,00250
<i>Gm13213</i>	0,55	1,46	0,00210
<i>Aldoart2</i>	0,51	1,42	0,00260
<i>Nkx3-2</i>	-0,58	-1,49	0,00290





## ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Dido1</i>	-0,59	-1,51	0,00190
<i>Zfp418</i>	-0,63	-1,55	0,00270
<i>Icosl</i>	-0,66	-1,58	0,00250
<i>Ncoa3</i>	-0,67	-1,59	0,00290
<i>Taok2</i>	-0,67	-1,59	0,00240
<i>Ttll3</i>	-0,68	-1,6	0,00210
<i>1700049G17Rik</i>	-0,68	-1,6	0,00150
<i>Arid3a</i>	-0,68	-1,6	0,00190
<i>Apobec2</i>	-0,70	-1,62	0,00120
<i>Csf1r</i>	-0,70	-1,62	0,00130
<i>Btbd3</i>	-0,70	-1,63	0,00260
<i>Dnm2</i>	-0,70	-1,63	0,00160
<i>Afmid</i>	-0,70	-1,63	0,00160
<i>Ep300</i>	-0,70	-1,63	0,00160
<i>Fam49b</i>	-0,70	-1,63	0,00110
<i>Herpud1</i>	-0,72	-1,65	0,00270
<i>Ceacam3</i>	-0,73	-1,66	0,00210
<i>Itgam</i>	-0,73	-1,66	0,00080
<i>Ptger3</i>	-0,74	-1,67	0,00260
<i>Pdlim5</i>	-0,74	-1,67	0,00200
<i>Gabbr1</i>	-0,74	-1,67	0,00120
<i>Cst13</i>	-0,76	-1,69	0,00280
<i>Mob3c</i>	-0,76	-1,69	0,00270
<i>Golm1</i>	-0,76	-1,69	0,00070
<i>Gspt1</i>	-0,76	-1,69	0,00200
<i>Tmem86b</i>	-0,77	-1,7	0,00140
<i>Gm3248</i>	-0,77	-1,7	0,00060
<i>Cxcr2</i>	-0,77	-1,71	0,00110
<i>Pfn2</i>	-0,77	-1,71	0,00230
<i>Zfp52</i>	-0,77	-1,71	0,00060
<i>Ms4a6b</i>	-0,77	-1,71	0,00110
<i>Tia1</i>	-0,78	-1,72	0,00270
<i>Zfp846</i>	-0,78	-1,72	0,00030
<i>Mknk2</i>	-0,78	-1,72	0,00250
<i>Son</i>	-0,78	-1,72	0,00090
<i>Ddb2</i>	-0,79	-1,73	0,00290
<i>Kmt2e</i>	-0,79	-1,73	0,00280
<i>Nova1</i>	-0,79	-1,73	0,00020
<i>BC024978</i>	-0,80	-1,74	0,00210
<i>Rasgrf2</i>	-0,80	-1,74	0,00280
<i>Cdk2ap1</i>	-0,81	-1,75	0,00180



## ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Cry1</i>	-0,81	-1,75	0,00070
<i>Tra2b</i>	-0,81	-1,75	0,00050
<i>Zfp605</i>	-0,82	-1,76	0,00160
<i>Camp</i>	-0,82	-1,76	0,00150
<i>Fgd3</i>	-0,82	-1,76	0,00170
<i>Fam102b</i>	-0,82	-1,77	0,00160
<i>Zfp329</i>	-0,82	-1,77	0,00090
<i>Ccdc162</i>	-0,82	-1,77	0,00110
<i>Adtrp</i>	-0,82	-1,77	0,00280
<i>Fbxw10</i>	-0,83	-1,78	0,00210
<i>Scube3</i>	-0,83	-1,78	0,00150
<i>Ldb1</i>	-0,83	-1,78	0,00110
<i>Selpig</i>	-0,84	-1,79	0,00020
<i>Lcat</i>	-0,84	-1,79	0,00020
<i>Myl2</i>	-0,85	-1,8	0,00160
<i>Chst8</i>	-0,85	-1,8	0,00050
<i>Brd2</i>	-0,85	-1,8	0,00210
<i>E330020D12Rik</i>	-0,86	-1,81	0,00220
<i>Calcr1</i>	-0,86	-1,81	0,00130
<i>Pde3b</i>	-0,86	-1,81	0,00040
<i>Avpr2</i>	-0,86	-1,81	0,00190
<i>Cln5</i>	-0,86	-1,81	0,00180
<i>Arrb2; Mir7115</i>	-0,86	-1,81	0,00140
<i>Inpp5d</i>	-0,86	-1,82	0,00180
<i>Tgfbp1</i>	-0,86	-1,82	0,00080
<i>Vsir</i>	-0,86	-1,82	0,00030
<i>Polr2h</i>	-0,86	-1,82	0,00180
<i>Klrd1</i>	-0,87	-1,83	0,00060
<i>6820431F20Rik; 2610005L07Rik</i>	-0,87	-1,83	0,00180
<i>Aftph</i>	-0,87	-1,83	0,00100
<i>Jarid2</i>	-0,87	-1,83	0,00230
<i>0610040J01Rik</i>	-0,88	-1,84	0,00150
<i>Zfp873</i>	-0,88	-1,84	0,00230
<i>Igfbp4</i>	-0,88	-1,84	0,00060
<i>Rere</i>	-0,89	-1,85	0,00150
<i>Wnk1</i>	-0,89	-1,85	0,00240
<i>Anks3</i>	-0,89	-1,85	0,00150
<i>Adgre4</i>	-0,89	-1,85	0,00040
<i>5830428H23Rik; Zfp950; Zfp826</i>	-0,89	-1,85	0,00250
<i>Ptdss2</i>	-0,90	-1,86	0,00090
<i>Tspan13</i>	-0,90	-1,86	0,00260



## ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Lcor</i>	-0,90	-1,87	0,00280
<i>Ppp1r15a</i>	-0,91	-1,88	0,00070
<i>Arhgef6</i>	-0,91	-1,88	0,00160
<i>Cacng2</i>	-0,91	-1,88	0,00160
<i>C5ar2</i>	-0,92	-1,89	0,00060
<i>Inpp4b</i>	-0,92	-1,89	0,00030
<i>Herc1</i>	-0,92	-1,89	0,00190
<i>Msl3l2</i>	-0,92	-1,89	0,00070
<i>Enc1</i>	-0,92	-1,89	0,00170
<i>Gzmb</i>	-0,92	-1,89	0,00230
<i>Mycbp</i>	-0,93	-1,9	0,00060
<i>Vps37b</i>	-0,93	-1,9	0,00180
<i>Clec4b1</i>	-0,93	-1,9	0,00230
<i>Trim11</i>	-0,93	-1,9	0,00140
<i>Atat1</i>	-0,93	-1,9	0,00290
<i>Vsig10l</i>	-0,93	-1,9	0,00180
<i>Exoc6b</i>	-0,93	-1,91	0,00210
<i>Zkscan3</i>	-0,93	-1,91	0,00030
<i>Spry1</i>	-0,94	-1,92	0,00080
<i>Ssbp3</i>	-0,94	-1,92	0,00070
<i>Zfp691</i>	-0,94	-1,92	0,00030
<i>Klhl18</i>	-0,94	-1,92	0,00180
<i>Wsb1</i>	-0,94	-1,92	0,00100
<i>Arhgap27</i>	-0,94	-1,92	0,00140
<i>Pnrc2</i>	-0,95	-1,93	0,00020
<i>Phf14</i>	-0,95	-1,93	0,00110
<i>Eif5; Snora28</i>	-0,96	-1,94	0,00290
<i>Zfp90</i>	-0,96	-1,95	0,00070
<i>Srsf2</i>	-0,96	-1,95	0,00010
<i>Sox4</i>	-0,96	-1,95	0,00220
<i>Kcnrg</i>	-0,96	-1,95	0,00130
<i>Fez2</i>	-0,96	-1,95	0,00140
<i>Tsc22d2</i>	-0,97	-1,96	0,00270
<i>D6Wsu163e</i>	-0,97	-1,96	0,00010
<i>Zfp62</i>	-0,97	-1,96	0,00040
<i>Ksr1</i>	-0,97	-1,96	0,00270
<i>Pld4</i>	-0,97	-1,96	0,00100
<i>Srsf3</i>	-0,97	-1,96	0,00020
<i>Bmp2k</i>	-0,98	-1,97	0,00050
<i>Daglb</i>	-0,98	-1,97	0,00230
<i>Cryba4</i>	-0,99	-1,98	0,00210



ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Bid</i>	-0,99	-1,98	0,00120
<i>Gab1</i>	-0,99	-1,99	0,00080
<i>Usp22</i>	-0,99	-1,99	0,00250
<i>Sla</i>	-0,99	-1,99	0,00130
<i>Sh3bp1</i>	-0,99	-1,99	0,00110
<i>Zfand5</i>	-0,99	-1,99	0,00030
<i>Sfpq</i>	-1,00	-2	0,00120
<i>Kptn</i>	-1,00	-2	0,00180
<i>Scube1</i>	-1,00	-2	0,00060
<i>Clk1</i>	-1,01	-2,01	0,00040
<i>Rgs1</i>	-1,01	-2,01	0,00250
<i>Duoxa1</i>	-1,01	-2,01	0,00020
<i>Glul; Mir8114</i>	-1,01	-2,02	0,00010
<i>Tlr3</i>	-1,01	-2,02	0,00100
<i>Znrf1</i>	-1,01	-2,02	0,00090
<i>5031414D18Rik</i>	-1,01	-2,02	0,00140
<i>Itpril1</i>	-1,02	-2,03	0,00290
<i>Ttf1</i>	-1,03	-2,04	0,00050
<i>Ikzf1</i>	-1,03	-2,04	0,00160
<i>Fam210a; Mir7219</i>	-1,03	-2,04	0,00170
<i>Hpgds</i>	-1,04	-2,05	0,00020
<i>RbmX</i>	-1,04	-2,05	0,00280
<i>Tpst2</i>	-1,04	-2,06	0,00150
<i>Entpd1</i>	-1,04	-2,06	0,00120
<i>Pmepa1</i>	-1,05	-2,07	0,00030
<i>Slc36a1</i>	-1,05	-2,07	0,00070
<i>D15Ert621e</i>	-1,05	-2,07	0,00130
<i>Bin2</i>	-1,06	-2,08	0,00120
<i>Lamtor3</i>	-1,06	-2,09	0,00070
<i>Erf</i>	-1,06	-2,09	0,00080
<i>Efnb2</i>	-1,06	-2,09	0,00040
<i>Gm10645</i>	-1,06	-2,09	0,00190
<i>Hlf</i>	-1,06	-2,09	0,00004
<i>Map4k5</i>	-1,06	-2,09	0,00080
<i>Nid2</i>	-1,06	-2,09	0,00010
<i>Nlrp1a</i>	-1,07	-2,1	0,00270
<i>Slc7a8</i>	-1,07	-2,1	0,00220
<i>Pygm</i>	-1,07	-2,1	0,00030
<i>Lyn</i>	-1,08	-2,11	0,00080
<i>Dip2b</i>	-1,08	-2,11	0,00010
<i>Ralgps2</i>	-1,08	-2,12	0,00060



## ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Ccnl1</i>	-1,08	-2,12	0,00040
<i>Whrn</i>	-1,08	-2,12	0,00040
<i>Mef2a</i>	-1,08	-2,12	0,00010
<i>Mmp2</i>	-1,08	-2,12	0,00030
<i>Pnp2</i>	-1,08	-2,12	0,00050
<i>Colq</i>	-1,08	-2,12	0,00200
<i>Lfng</i>	-1,09	-2,13	0,00090
<i>Cebpd</i>	-1,09	-2,13	0,00050
<i>Slc16a6</i>	-1,10	-2,14	0,00020
<i>March1</i>	-1,10	-2,15	0,00180
<i>Tcf4</i>	-1,10	-2,15	0,00020
<i>Zfp710</i>	-1,12	-2,17	0,00190
<i>Snupn</i>	-1,12	-2,17	0,00290
<i>Rhobtb1</i>	-1,12	-2,17	0,00040
<i>Trim47</i>	-1,12	-2,17	0,00290
<i>Mrc1</i>	-1,12	-2,18	0,00160
<i>Cttnbp2nl</i>	-1,12	-2,18	0,00009
<i>Nbeal2; Mir8107</i>	-1,12	-2,18	0,00020
<i>Hist1h2be; Hist1h1e</i>	-1,12	-2,18	0,00280
<i>Dok3</i>	-1,12	-2,18	0,00080
<i>Sall3</i>	-1,12	-2,18	0,00030
<i>Papd5</i>	-1,13	-2,19	0,00050
<i>Pthr2</i>	-1,13	-2,19	0,00080
<i>Slc5a10</i>	-1,13	-2,19	0,00060
<i>Impact</i>	-1,13	-2,19	0,00040
<i>Mex3b</i>	-1,14	-2,2	0,00050
<i>Slc25a37</i>	-1,14	-2,2	0,00150
<i>Mpi</i>	-1,14	-2,21	0,00050
<i>Chsy1</i>	-1,15	-2,22	0,00070
<i>Scamp5</i>	-1,15	-2,22	0,00010
<i>Scoc</i>	-1,16	-2,23	0,00190
<i>Gm6568</i>	-1,16	-2,23	0,00002
<i>Myliip</i>	-1,16	-2,23	0,00120
<i>Wwc2</i>	-1,16	-2,24	0,00190
<i>Olfml2b</i>	-1,17	-2,25	0,00180
<i>Abca1</i>	-1,17	-2,25	0,00280
<i>Tug1</i>	-1,17	-2,25	0,00050
<i>Cbr2</i>	-1,17	-2,25	0,00190
<i>Rpp38</i>	-1,18	-2,26	0,00290
<i>Lpcat3</i>	-1,18	-2,26	0,00030
<i>Arid4a</i>	-1,18	-2,26	0,00220



ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Sema6d</i>	-1,18	-2,27	0,00210
<i>Plcg1</i>	-1,18	-2,27	0,00008
<i>Idh2</i>	-1,18	-2,27	0,00240
<i>Arhgap4</i>	-1,18	-2,27	0,00040
<i>Zdhhc14</i>	-1,19	-2,28	0,00020
<i>Stard9</i>	-1,20	-2,29	0,00020
<i>Snn</i>	-1,20	-2,29	0,00090
<i>Plekho1</i>	-1,20	-2,3	0,00003
<i>Hpgd</i>	-1,20	-2,3	0,00010
<i>Kbtbd7</i>	-1,20	-2,3	0,00030
<i>Btg2</i>	-1,21	-2,31	0,00050
<i>Cysltr1</i>	-1,21	-2,31	0,00006
<i>Mycbp2</i>	-1,21	-2,31	0,00050
<i>Gcnt1</i>	-1,21	-2,32	0,00080
<i>Zscan18</i>	-1,23	-2,34	0,00020
<i>Tifab</i>	-1,23	-2,34	0,00020
<i>Ptpm</i>	-1,23	-2,34	0,00090
<i>Pip4k2a</i>	-1,23	-2,35	0,00006
<i>Chd2; 1810026B05Rik</i>	-1,23	-2,35	0,00006
<i>Ggt5</i>	-1,23	-2,35	0,00130
<i>Dnajb9</i>	-1,23	-2,35	0,00004
<i>Gpm</i>	-1,23	-2,35	0,00030
<i>Tjp1</i>	-1,24	-2,36	0,00050
<i>Dock8</i>	-1,24	-2,36	0,00020
<i>Casp8</i>	-1,24	-2,37	0,00004
<i>Tbpl1</i>	-1,24	-2,37	0,00140
<i>Zmym2</i>	-1,24	-2,37	0,00040
<i>Tsc22d3</i>	-1,25	-2,38	0,00020
<i>Tanc2</i>	-1,26	-2,39	0,00030
<i>Slc38a2</i>	-1,26	-2,39	0,00004
<i>Uhrf1bp1</i>	-1,27	-2,41	0,00070
<i>Maf</i>	-1,28	-2,42	0,00160
<i>Numb</i>	-1,28	-2,42	0,00020
<i>Gm7694</i>	-1,29	-2,44	0,00010
<i>Cmtm6</i>	-1,29	-2,44	0,00040
<i>Sort1</i>	-1,29	-2,45	0,00030
<i>Dnaja1; Mir207</i>	-1,29	-2,45	0,00180
<i>Prpsap2</i>	-1,29	-2,45	0,00007
<i>Zfp532</i>	-1,29	-2,45	0,00060
<i>Rragc</i>	-1,30	-2,46	0,00090
<i>Rsrp1</i>	-1,30	-2,46	0,00020



## ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Gpr183</i>	-1,30	-2,46	0,00040
<i>Ccdc152</i>	-1,30	-2,46	0,00005
<i>Soga1</i>	-1,30	-2,47	0,00180
<i>Rhoh</i>	-1,31	-2,48	0,00230
<i>Pnp</i>	-1,31	-2,48	0,00090
<i>Ceacam2</i>	-1,32	-2,49	0,00020
<i>Zfp36</i>	-1,32	-2,49	0,00010
<i>Chd9</i>	-1,32	-2,49	0,00130
<i>Abcc3</i>	-1,32	-2,5	0,00030
<i>Zfp60</i>	-1,33	-2,51	0,00030
<i>Pten</i>	-1,33	-2,51	0,00020
<i>Cd33</i>	-1,33	-2,52	0,00001
<i>Aste1</i>	-1,33	-2,52	0,00080
<i>A730008H23Rik; Hjurp; 6430706D22Rik</i>	-1,34	-2,53	0,00002
<i>Phyhd1</i>	-1,34	-2,53	0,00030
<i>Herc2</i>	-1,34	-2,53	0,00230
<i>Kcnj12</i>	-1,34	-2,53	0,00230
<i>Ier5</i>	-1,35	-2,55	0,00010
<i>Azin1</i>	-1,35	-2,55	0,00190
<i>Ccnt2</i>	-1,37	-2,58	0,00130
<i>Mtus1</i>	-1,37	-2,58	0,00050
<i>Arhgap39</i>	-1,37	-2,58	0,00260
<i>Prkce</i>	-1,37	-2,58	0,00002
<i>Atp8a2</i>	-1,37	-2,59	0,00070
<i>Ptgs1</i>	-1,38	-2,6	0,00020
<i>Snta1</i>	-1,38	-2,6	0,00040
<i>Cd164</i>	-1,38	-2,61	0,00001
<i>Prps111</i>	-1,38	-2,61	0,00010
<i>Map3k9</i>	-1,38	-2,61	0,00020
<i>Gm10392</i>	-1,39	-2,62	0,00050
<i>Actn1</i>	-1,39	-2,62	0,00060
<i>Fosb</i>	-1,40	-2,63	0,00030
<i>Tagap1</i>	-1,40	-2,63	0,00230
<i>Atf7ip</i>	-1,40	-2,64	0,00030
<i>Vrk1</i>	-1,40	-2,64	0,00030
<i>Gbp7</i>	-1,41	-2,65	0,00050
<i>St3gal5</i>	-1,41	-2,65	0,00003
<i>Lrrc3</i>	-1,41	-2,65	0,00280
<i>Tspan14</i>	-1,41	-2,65	0,00020
<i>Cfap74; C030017K20Rik</i>	-1,41	-2,66	0,00004
<i>Klk8</i>	-1,41	-2,66	0,00010



ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Slco2b1</i>	-1,41	-2,66	0,00004
<i>Nlrp1b</i>	-1,42	-2,67	0,00005
<i>Etv5</i>	-1,42	-2,67	0,00040
<i>Ppp4r1</i>	-1,42	-2,67	0,00140
<i>P2ry12</i>	-1,42	-2,68	0,00000
<i>Stambpl1</i>	-1,43	-2,7	0,00005
<i>Gtf2h2</i>	-1,44	-2,71	0,00010
<i>Arid3b</i>	-1,45	-2,73	0,00010
<i>Rasgrp4</i>	-1,46	-2,75	0,00010
<i>Nfam1</i>	-1,46	-2,75	0,00008
<i>Mterf2</i>	-1,46	-2,76	0,00020
<i>Usp16</i>	-1,47	-2,77	0,00270
<i>Slc39a12</i>	-1,48	-2,78	0,00010
<i>Zfp59</i>	-1,48	-2,78	0,00240
<i>Lypd6</i>	-1,48	-2,79	0,00070
<i>Tmem8c</i>	-1,48	-2,79	0,00030
<i>Mgat4a</i>	-1,49	-2,81	0,00240
<i>Tcf7l2</i>	-1,49	-2,81	0,00220
<i>Dapp1</i>	-1,50	-2,83	0,00060
<i>Klf6</i>	-1,50	-2,83	0,00010
<i>Tmem204</i>	-1,50	-2,83	0,00004
<i>Camk2d</i>	-1,51	-2,85	0,00002
<i>Fgd2</i>	-1,51	-2,85	0,00010
<i>Tgm2</i>	-1,52	-2,86	0,00070
<i>Lyl1</i>	-1,52	-2,87	0,00002
<i>Kctd12; Mir5130</i>	-1,54	-2,91	0,00040
<i>Myo1b</i>	-1,55	-2,92	0,00020
<i>Atf3</i>	-1,55	-2,92	0,00001
<i>Hsp90aa1</i>	-1,55	-2,93	0,00170
<i>Zswim6</i>	-1,55	-2,93	0,00040
<i>Egr1</i>	-1,56	-2,94	0,00003
<i>Il17ra</i>	-1,57	-2,96	0,00070
<i>Abl1</i>	-1,57	-2,97	0,00009
<i>Prkab1</i>	-1,57	-2,97	0,00040
<i>Lpcat2</i>	-1,58	-2,99	0,00001
<i>Dusp6</i>	-1,58	-3	0,00040
<i>Csmd3</i>	-1,58	-3	0,00170
<i>Ggta1</i>	-1,59	-3,01	0,00020
<i>Tle3</i>	-1,59	-3,01	0,00070
<i>Cass4</i>	-1,60	-3,03	0,00050
<i>Crim1</i>	-1,60	-3,04	0,00190





## ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Frmd4a</i>	-1,62	-3,08	0,00003
<i>Arap3; Mir6981</i>	-1,63	-3,1	0,00060
<i>Gal3st4</i>	-1,64	-3,12	0,00001
<i>Hspa1b; Hspa1a</i>	-1,65	-3,14	0,00090
<i>Rhob</i>	-1,66	-3,15	0,00050
<i>Flcn</i>	-1,67	-3,18	0,00030
<i>Bcl9l</i>	-1,68	-3,2	0,00008
<i>Il6ra</i>	-1,68	-3,21	0,00070
<i>Gm10340</i>	-1,68	-3,21	0,00240
<i>Gm2956</i>	-1,68	-3,21	0,00240
<i>Gm3752; Gm2897</i>	-1,69	-3,23	0,00210
<i>Ddit3</i>	-1,70	-3,24	0,00001
<i>Cacnb2</i>	-1,70	-3,25	0,00004
<i>Nlrp1c-ps</i>	-1,70	-3,26	0,00020
<i>Prkca</i>	-1,71	-3,27	0,00020
<i>Ptpro</i>	-1,71	-3,28	0,00010
<i>Plxna4</i>	-1,73	-3,31	0,00008
<i>Tlr5</i>	-1,73	-3,32	0,00030
<i>Eef2k</i>	-1,75	-3,36	0,00010
<i>Ppp1r10; Mir1894</i>	-1,75	-3,37	0,00004
<i>Fam72a</i>	-1,76	-3,38	0,00001
<i>Slc40a1</i>	-1,77	-3,4	0,00002
<i>Fos</i>	-1,77	-3,41	0,00001
<i>Ceacam1</i>	-1,78	-3,44	0,00000
<i>Chst7</i>	-1,79	-3,46	0,00002
<i>Grap</i>	-1,79	-3,47	0,00007
<i>Slc26a11</i>	-1,80	-3,48	0,00010
<i>Rgs2</i>	-1,81	-3,5	0,00000
<i>Nos1ap</i>	-1,81	-3,51	0,00001
<i>Rad9b</i>	-1,82	-3,52	0,00140
<i>Hspa1a</i>	-1,82	-3,52	0,00250
<i>Gna15</i>	-1,84	-3,58	0,00000
<i>Nhsl2</i>	-1,85	-3,61	0,00004
<i>Dock10</i>	-1,86	-3,62	0,00001
<i>Mtss1</i>	-1,86	-3,62	0,00008
<i>Srgap2</i>	-1,86	-3,63	0,00000
<i>Siglece</i>	-1,86	-3,63	0,00010
<i>Pde1b</i>	-1,86	-3,63	0,00030
<i>Tmem173</i>	-1,87	-3,66	0,00000
<i>Etv1</i>	-1,88	-3,69	0,00020
<i>Cep68</i>	-1,89	-3,7	0,00010



ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Fcr11</i>	-1,90	-3,72	0,00002
<i>Jun</i>	-1,91	-3,75	0,00000
<i>Sall1</i>	-1,91	-3,75	0,00006
<i>Ivns1abp</i>	-1,91	-3,77	0,00003
<i>Dnajb1</i>	-1,91	-3,77	0,00030
<i>Nuak1</i>	-1,93	-3,81	0,00003
<i>Dnajb4</i>	-1,94	-3,83	0,00001
<i>Tm6sf1</i>	-1,94	-3,84	0,00005
<i>Tagap</i>	-1,95	-3,86	0,00006
<i>Fam105a</i>	-1,96	-3,89	0,00002
<i>Ddit3</i>	-1,96	-3,9	0,00001
<i>Agmo</i>	-1,97	-3,91	0,00000
<i>Gm3005; Gm2897</i>	-1,97	-3,92	0,00100
<i>I830077J02Rik</i>	-1,98	-3,95	0,00007
<i>Zfhx3</i>	-1,99	-3,97	0,00010
<i>Hrh2</i>	-2,00	-3,99	0,00050
<i>Txnip</i>	-2,01	-4,04	0,00000
<i>Rps6ka1</i>	-2,02	-4,06	0,00002
<i>Slco4a1</i>	-2,03	-4,08	0,00004
<i>Klf2</i>	-2,04	-4,1	0,00006
<i>Rapgef5</i>	-2,04	-4,11	0,00000
<i>Rb1</i>	-2,05	-4,15	0,00008
<i>Adgrg1</i>	-2,07	-4,2	0,00000
<i>Clec4a3</i>	-2,10	-4,3	0,00001
<i>S100a8</i>	-2,11	-4,31	0,00170
<i>P2ry13</i>	-2,11	-4,32	0,00000
<i>Gpr165</i>	-2,12	-4,35	0,00000
<i>Nrip1</i>	-2,14	-4,4	0,00006
<i>Pld1</i>	-2,15	-4,44	0,00001
<i>Elmo1</i>	-2,19	-4,55	0,00001
<i>Slc2a5</i>	-2,22	-4,67	0,00000
<i>Fam71a</i>	-2,28	-4,84	0,00007
<i>BC035044</i>	-2,30	-4,94	0,00001
<i>Dock4</i>	-2,32	-4,98	0,00010
<i>Kcnd1</i>	-2,37	-5,16	0,00002
<i>Rtn1</i>	-2,37	-5,16	0,00004
<i>Il7r</i>	-2,45	-5,46	0,00000
<i>Lst1</i>	-2,48	-5,56	0,00000
<i>Lpar6</i>	-2,48	-5,59	0,00000
<i>Khdrbs3</i>	-2,53	-5,77	0,00001
<i>Ccr5</i>	-2,54	-5,83	0,00000



## ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Epha2</i>	-2,66	-6,33	0,00001
<i>Clec4a2</i>	-2,73	-6,64	0,00000
<i>Ecscr</i>	-2,76	-6,78	0,00000
<i>Adrb2</i>	-2,88	-7,38	0,00000
<i>Crybb1</i>	-2,94	-7,67	0,00000
<i>Gm20481</i>	-3,14	-8,79	0,00050
<i>Stab1</i>	-3,17	-8,99	0,00000
<i>Upk1b</i>	-3,18	-9,06	0,00000
<i>Arrdc3</i>	-3,18	-9,09	0,00000
<i>Itga9</i>	-3,38	-10,41	0,00000
<i>Tmem119</i>	-3,49	-11,2	0,00000
<i>Bank1</i>	-3,99	-15,86	0,00000



## Tabla suplementaria 6

**Tabla suplementaria 6. Genes diferencialmente expresados en la microglía de ratones MAPTp.P301S versus a la de ratones WT.** Genes que incrementan y disminuyen su expresión en la microglía de ratones MAPTp.P301S de 9 meses de edad versus a la microglía de ratones WT de 12 meses de edad. ( $|\log FC| > 0,5$  y  $p < 0,05$ ).

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Clec7a</i>	9,39	669,24	0,00000
<i>Spp1</i>	8,37	330,59	0,00000
<i>Axl</i>	8,33	320,73	0,00000
<i>Apoe</i>	7,60	194,67	0,00000
<i>Cst7</i>	7,24	151,09	0,00000
<i>Itgax</i>	7,06	133,26	0,00000
<i>Cd74; Mir5107</i>	6,48	89,2	0,00000
<i>Mmp12</i>	6,18	72,33	0,00000
<i>Ifi204</i>	6,08	67,71	0,00000
<i>Olr1</i>	5,97	62,90	0,00000
<i>Cybb</i>	5,81	56,13	0,00000
<i>Mnda</i>	5,68	51,23	0,00000
<i>H2-Ab1</i>	5,58	47,84	0,00000
<i>Ifitm3</i>	5,33	40,34	0,00000
<i>H2-Eb1</i>	5,21	36,89	0,00000
<i>Al607873</i>	5,06	33,31	0,00000
<i>Il1rn</i>	4,77	27,3	0,00000
<i>Lilrb4a</i>	4,58	23,97	0,00000
<i>Slfn5</i>	4,43	21,62	0,00000
<i>Ccl6</i>	4,43	21,53	0,00000
<i>C3</i>	4,41	21,32	0,00000
<i>Csf1</i>	4,16	17,87	0,00000
<i>St8sia6</i>	4,11	17,32	0,00000
<i>H2-Aa</i>	4,00	15,95	0,00000
<i>Ptgs2</i>	3,98	15,76	0,00000
<i>Cd69</i>	3,94	15,38	0,00000
<i>Cxcl2</i>	3,94	15,37	0,00000
<i>Igf1</i>	3,91	15,04	0,00000
<i>Plin2</i>	3,87	14,64	0,00001
<i>Clic4</i>	3,85	14,43	0,00000
<i>Fcgr4</i>	3,79	13,85	0,00000
<i>Fabp5</i>	3,65	12,59	0,00000
<i>Klrb1b</i>	3,62	12,27	0,00000
<i>Il1b</i>	3,60	12,13	0,00000
<i>Anxa5</i>	3,58	12	0,00007
<i>Oas1a</i>	3,58	11,93	0,00000



## ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Rai14</i>	3,55	11,73	0,00000
<i>Siglec</i>	3,54	11,66	0,00000
<i>Lgals3bp</i>	3,48	11,17	0,00000
<i>Cfb</i>	3,47	11,11	0,00000
<i>Lyz2</i>	3,47	11,08	0,00000
<i>Vat1</i>	3,46	10,97	0,00000
<i>Il2rg</i>	3,45	10,91	0,00000
<i>Al504432</i>	3,44	10,84	0,00000
<i>Cd200r4</i>	3,38	10,44	0,00000
<i>Cxcl13</i>	3,37	10,32	0,00020
<i>Rtp4</i>	3,33	10,04	0,00000
<i>Ephx1</i>	3,30	9,83	0,00000
<i>Irg1</i>	3,26	9,59	0,00000
<i>Oas1g</i>	3,26	9,56	0,00000
<i>Lgals3</i>	3,26	9,55	0,00000
<i>Slamf9</i>	3,25	9,49	0,00000
<i>Glpr1</i>	3,23	9,38	0,00005
<i>Ch25h</i>	3,21	9,27	0,00020
<i>H2-L; H2-D1</i>	3,20	9,22	0,00000
<i>Cd52</i>	3,20	9,2	0,00000
<i>Ank; Mir7117</i>	3,19	9,13	0,00000
<i>Tnf</i>	3,18	9,09	0,00001
<i>Postn</i>	3,14	8,79	0,00000
<i>Cdkn1a</i>	3,12	8,72	0,00007
<i>Fabp3</i>	3,12	8,69	0,00000
<i>Myo1e</i>	3,09	8,53	0,00000
<i>Scimp</i>	3,08	8,48	0,00000
<i>Sdc3</i>	3,07	8,42	0,00000
<i>Etl4</i>	3,00	8,01	0,00000
<i>Apobec1</i>	2,99	7,94	0,00000
<i>Ms4a7</i>	2,95	7,71	0,00010
<i>Pacs1n1</i>	2,94	7,7	0,00002
<i>Ifi44</i>	2,90	7,48	0,00230
<i>Cox6a2</i>	2,90	7,46	0,00000
<i>Nfil3</i>	2,88	7,35	0,00020
<i>Capg</i>	2,87	7,31	0,00000
<i>Cxcr4</i>	2,86	7,27	0,00000
<i>Echs1</i>	2,86	7,26	0,00010
<i>Plaur</i>	2,85	7,23	0,00003
<i>Sp100</i>	2,85	7,2	0,00000
<i>Ptger4</i>	2,85	7,19	0,00000
<i>Bola2</i>	2,82	7,04	0,00000



ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Cpd</i>	2,81	7,03	0,00001
<i>Slfn2</i>	2,80	6,95	0,00008
<i>Sdc4</i>	2,77	6,84	0,00000
<i>Gm6377</i>	2,76	6,77	0,00002
<i>Cxcl16</i>	2,74	6,7	0,00000
<i>Ly9</i>	2,74	6,67	0,00007
<i>Ccl9</i>	2,73	6,62	0,00000
<i>Gpr65</i>	2,73	6,62	0,00000
<i>Slamf7</i>	2,72	6,57	0,00001
<i>Olfr110</i>	2,71	6,55	0,00000
<i>1500012F01Rik; Snord12</i>	2,70	6,49	0,00000
<i>Ifi2712a</i>	2,68	6,42	0,00000
<i>Tnfsf9</i>	2,67	6,36	0,00000
<i>Olfr111</i>	2,65	6,28	0,00000
<i>Sulf2</i>	2,64	6,23	0,00000
<i>Isg15</i>	2,63	6,19	0,00006
<i>Bcl2a1c</i>	2,63	6,19	0,00000
<i>Dhx58</i>	2,62	6,15	0,00010
<i>Alcam</i>	2,59	6,03	0,00000
<i>Ccl12</i>	2,59	6,01	0,00001
<i>Lilr4b</i>	2,58	5,99	0,00002
<i>Tgtp2</i>	2,56	5,91	0,00008
<i>Rnf149</i>	2,55	5,86	0,00001
<i>Zbp1</i>	2,55	5,85	0,00003
<i>Il12b</i>	2,55	5,84	0,00000
<i>Rhoc</i>	2,54	5,82	0,00004
<i>Cd72</i>	2,54	5,81	0,00010
<i>H2-Q2</i>	2,51	5,71	0,00000
<i>Milr1</i>	2,51	5,69	0,00001
<i>Ifi441</i>	2,50	5,66	0,00270
<i>Samd9l</i>	2,50	5,64	0,00008
<i>Rpl12; Snora65</i>	2,48	5,59	0,00001
<i>Hcar2</i>	2,48	5,59	0,00010
<i>Atox1</i>	2,48	5,58	0,00003
<i>Stat1</i>	2,48	5,56	0,00002
<i>Tmsb10</i>	2,48	5,56	0,00000
<i>Cd63</i>	2,48	5,56	0,00000
<i>Smim3</i>	2,48	5,56	0,00000
<i>Itgad</i>	2,46	5,5	0,00001
<i>Phlda1</i>	2,44	5,42	0,00001
<i>Gm4951</i>	2,44	5,42	0,00020



## ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Atp1a3</i>	2,43	5,4	0,00000
<i>Bst2</i>	2,43	5,39	0,00005
<i>Coro1c</i>	2,43	5,38	0,00004
<i>Usp18</i>	2,43	5,38	0,00001
<i>Slc7a11</i>	2,42	5,34	0,00009
<i>Phf11b</i>	2,41	5,31	0,00000
<i>Gpnmb</i>	2,41	5,3	0,00080
<i>Lrpap1</i>	2,40	5,26	0,00000
<i>Gm9396</i>	2,39	5,25	0,00001
<i>Mndal</i>	2,39	5,24	0,00001
<i>Rap2b</i>	2,38	5,2	0,00002
<i>Tmem106a</i>	2,36	5,15	0,00003
<i>Tmppe; Glb1</i>	2,30	4,92	0,00000
<i>Npc2</i>	2,27	4,83	0,00000
<i>Phf11d; Phf11c</i>	2,27	4,82	0,00003
<i>Sowahc</i>	2,27	4,81	0,00001
<i>Klrb1a</i>	2,26	4,8	0,00002
<i>Apbb2</i>	2,26	4,78	0,00000
<i>Ptchd1</i>	2,25	4,76	0,00001
<i>Anxa2</i>	2,23	4,7	0,00009
<i>Fgr</i>	2,23	4,69	0,00000
<i>Cers6</i>	2,22	4,67	0,00000
<i>Paox</i>	2,22	4,66	0,00001
<i>Fxyd6</i>	2,22	4,65	0,00000
<i>Ms4a4c</i>	2,21	4,64	0,00030
<i>Cd48</i>	2,20	4,61	0,00004
<i>Itga5</i>	2,20	4,6	0,00060
<i>Gm9844</i>	2,19	4,56	0,00000
<i>Cstb</i>	2,18	4,52	0,00000
<i>Pyhin1</i>	2,16	4,47	0,00010
<i>H2-M3</i>	2,16	4,46	0,00000
<i>Lyz1</i>	2,15	4,44	0,00000
<i>Arl5c</i>	2,15	4,44	0,00002
<i>Cd34</i>	2,14	4,41	0,00000
<i>Mif</i>	2,13	4,39	0,00001
<i>Gch1</i>	2,13	4,39	0,00000
<i>Gas2l3</i>	2,13	4,37	0,00000
<i>Adssl1</i>	2,13	4,37	0,00002
<i>Ctla2b</i>	2,13	4,37	0,00020
<i>Plau</i>	2,12	4,36	0,00003
<i>Fundc2</i>	2,12	4,35	0,00001



ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Psm6</i>	2,10	4,28	0,00000
<i>Cxcl10</i>	2,09	4,26	0,00060
<i>H2-Q7; H2-Q9</i>	2,09	4,26	0,00001
<i>Plk2</i>	2,08	4,22	0,00003
<i>Tpi1</i>	2,07	4,2	0,00002
<i>H2-K1</i>	2,06	4,17	0,00001
<i>Ndufv3</i>	2,05	4,14	0,00005
<i>Tlr1</i>	2,04	4,1	0,00003
<i>Cd36</i>	2,03	4,08	0,00020
<i>Rtcb</i>	2,02	4,06	0,00020
<i>Irf7</i>	2,01	4,04	0,00120
<i>Kcnj2</i>	2,01	4,02	0,00001
<i>Cdk1</i>	2,00	4,01	0,00130
<i>Lag3</i>	2,00	4	0,00003
<i>H2-Q5</i>	2,00	4	0,00002
<i>Mrpl33</i>	2,00	3,99	0,00010
<i>Aldoa</i>	1,99	3,96	0,00010
<i>Cd9</i>	1,97	3,92	0,00000
<i>Gng12</i>	1,97	3,91	0,00000
<i>Ttyh2</i>	1,96	3,9	0,00005
<i>Gm10715</i>	1,96	3,89	0,00150
<i>BC094916</i>	1,96	3,88	0,00001
<i>Tank</i>	1,96	3,88	0,00030
<i>Sh3bgrl</i>	1,94	3,85	0,00010
<i>Ddhd1; Mir5131</i>	1,94	3,85	0,00002
<i>Clec1b</i>	1,94	3,83	0,00005
<i>Timp2</i>	1,94	3,83	0,00001
<i>Ccl4</i>	1,93	3,82	0,00006
<i>Ms4a6c</i>	1,93	3,81	0,00040
<i>Got1</i>	1,93	3,81	0,00030
<i>Osbpl8</i>	1,91	3,77	0,00000
<i>H2-Oa</i>	1,91	3,75	0,00240
<i>Tlr2</i>	1,88	3,68	0,00010
<i>Rpl10a</i>	1,88	3,67	0,00001
<i>H2-T22; H2-T9</i>	1,86	3,64	0,00001
<i>Tubb6</i>	1,86	3,64	0,00002
<i>Eef1b2</i>	1,86	3,62	0,00060
<i>Lsm4</i>	1,86	3,62	0,00004
<i>Rps10</i>	1,85	3,6	0,00040
<i>Psmg4</i>	1,84	3,59	0,00009
<i>Pkm</i>	1,83	3,56	0,00020





## ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Igfbp1</i>	1,82	3,52	0,00030
<i>Ass1; Gm5424</i>	1,81	3,51	0,00240
<i>Acaca</i>	1,81	3,51	0,00110
<i>Myeov2</i>	1,81	3,5	0,00005
<i>Bhlhe40</i>	1,80	3,48	0,00001
<i>Hscb</i>	1,79	3,47	0,00003
<i>AB124611</i>	1,79	3,47	0,00001
<i>Nceh1</i>	1,79	3,45	0,00180
<i>Hif1a</i>	1,79	3,45	0,00002
<i>B4galnt1</i>	1,78	3,44	0,00002
<i>Rab7b</i>	1,76	3,39	0,00001
<i>Mapkapk2</i>	1,76	3,39	0,00020
<i>Fam20c</i>	1,76	3,38	0,00008
<i>Trim30a</i>	1,76	3,38	0,00020
<i>Bcl2a1d</i>	1,75	3,37	0,00001
<i>Pgam1</i>	1,75	3,37	0,00070
<i>Atp5k</i>	1,75	3,36	0,00003
<i>Gnb2l1; Snord96a; Snord95</i>	1,74	3,35	0,00070
<i>Trappc2l</i>	1,74	3,34	0,00050
<i>Ssr4</i>	1,73	3,32	0,00003
<i>Rpl36al</i>	1,73	3,31	0,00040
<i>Tspo</i>	1,73	3,31	0,00040
<i>Cd14</i>	1,72	3,29	0,00020
<i>Cd274</i>	1,72	3,29	0,00140
<i>Fxyd5; Mir7050</i>	1,71	3,28	0,00002
<i>Arpp19</i>	1,71	3,28	0,00010
<i>Hint1</i>	1,71	3,28	0,00060
<i>H2-DMa</i>	1,71	3,28	0,00006
<i>Rpl23</i>	1,71	3,27	0,00004
<i>Rpl39</i>	1,70	3,26	0,00001
<i>Wfdc17</i>	1,70	3,26	0,00130
<i>Cd68</i>	1,70	3,26	0,00003
<i>Tmem256</i>	1,70	3,25	0,00005
<i>Psme1</i>	1,70	3,24	0,00004
<i>Ap2s1</i>	1,68	3,2	0,00150
<i>Rplp2; Snora52</i>	1,67	3,19	0,00080
<i>Smpdl3a</i>	1,67	3,18	0,00010
<i>Cd83</i>	1,67	3,18	0,00030
<i>Gm1673</i>	1,66	3,16	0,00007
<i>Ggct</i>	1,66	3,15	0,00020
<i>Uap111</i>	1,65	3,14	0,00001



ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Atp6v0e</i>	1,65	3,14	0,00040
<i>Cops6</i>	1,65	3,13	0,00040
<i>Med28</i>	1,64	3,12	0,00130
<i>Arrdc4</i>	1,64	3,12	0,00008
<i>Aplp2</i>	1,63	3,1	0,00000
<i>Ccl3</i>	1,63	3,1	0,00010
<i>Ctsz</i>	1,62	3,07	0,00000
<i>Sod2</i>	1,62	3,07	0,00010
<i>Pea15a</i>	1,61	3,06	0,00008
<i>Alas1</i>	1,61	3,06	0,00004
<i>Soat1</i>	1,60	3,04	0,00004
<i>Psm8</i>	1,60	3,04	0,00030
<i>Gnptab</i>	1,59	3,02	0,00004
<i>Igsf6</i>	1,59	3,01	0,00070
<i>Lat2</i>	1,58	3	0,00006
<i>Amdhd2</i>	1,58	3	0,00010
<i>Fblim1</i>	1,58	2,99	0,00004
<i>Calm3</i>	1,58	2,99	0,00070
<i>Myo5a</i>	1,58	2,98	0,00060
<i>Ell2</i>	1,57	2,97	0,00020
<i>Cd99</i>	1,57	2,97	0,00200
<i>Bag1</i>	1,57	2,96	0,00040
<i>Rilpl2</i>	1,57	2,96	0,00009
<i>F9</i>	1,57	2,96	0,00050
<i>Rpl36a</i>	1,56	2,95	0,00001
<i>Chst1</i>	1,55	2,92	0,00070
<i>Glmpl</i>	1,55	2,92	0,00120
<i>Gna13</i>	1,55	2,92	0,00020
<i>Vegfa</i>	1,55	2,92	0,00007
<i>Pgap1</i>	1,54	2,91	0,00010
<i>Pdcd1</i>	1,54	2,91	0,00050
<i>Atp6v1f</i>	1,54	2,91	0,00030
<i>Eif3k</i>	1,54	2,91	0,00070
<i>Preli1</i>	1,54	2,91	0,00150
<i>H2-T23</i>	1,54	2,91	0,00005
<i>Gm10720</i>	1,54	2,9	0,00250
<i>2410015M20Rik</i>	1,54	2,9	0,00004
<i>Arhgap15</i>	1,53	2,89	0,00008
<i>Cd300lh; Gm11711</i>	1,53	2,89	0,00010
<i>Gusb</i>	1,53	2,88	0,00010
<i>Atp6v1b2</i>	1,52	2,87	0,00170



## ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Ggh</i>	1,52	2,86	0,00040
<i>Gm11710; Gm11711; Cd300lh</i>	1,51	2,85	0,00009
<i>Tpd52</i>	1,51	2,84	0,00030
<i>Adap1</i>	1,51	2,84	0,00003
<i>Gca</i>	1,50	2,83	0,00040
<i>Tmem176a</i>	1,50	2,83	0,00040
<i>Pianp</i>	1,50	2,83	0,00030
<i>Rps15a</i>	1,50	2,82	0,00003
<i>Dnase1l1</i>	1,50	2,82	0,00020
<i>Phf11a</i>	1,50	2,82	0,00030
<i>Zbtb8os</i>	1,49	2,81	0,00030
<i>3110040N11Rik</i>	1,49	2,81	0,00020
<i>Crip1</i>	1,49	2,81	0,00010
<i>Vkorc1</i>	1,49	2,8	0,00030
<i>Cyp4f18</i>	1,49	2,8	0,00010
<i>Bcl2a1a</i>	1,49	2,8	0,00008
<i>Hist1h1c</i>	1,49	2,8	0,00040
<i>Ctse</i>	1,48	2,79	0,00001
<i>Gm5428</i>	1,48	2,79	0,00060
<i>H2-Q8; H2-Q6</i>	1,48	2,79	0,00005
<i>Egln3</i>	1,48	2,78	0,00006
<i>Swi5</i>	1,47	2,77	0,00030
<i>Sdf4</i>	1,47	2,77	0,00030
<i>Apoc2; Apoc4</i>	1,47	2,77	0,00010
<i>LOC100862223</i>	1,46	2,76	0,00001
<i>Hgf</i>	1,45	2,74	0,00020
<i>Hyi</i>	1,45	2,73	0,00007
<i>Enpp1</i>	1,45	2,73	0,00006
<i>Prdm1</i>	1,45	2,73	0,00070
<i>Rpl32l</i>	1,44	2,72	0,00002
<i>Guca1a</i>	1,44	2,72	0,00020
<i>Ccl5</i>	1,44	2,71	0,00010
<i>Fn1</i>	1,43	2,7	0,00110
<i>Akr1a1</i>	1,43	2,7	0,00060
<i>Shisa5</i>	1,43	2,7	0,00030
<i>Gm2a</i>	1,43	2,7	0,00010
<i>Ifi30</i>	1,43	2,69	0,00005
<i>Gltp</i>	1,42	2,68	0,00010
<i>Ndufb2</i>	1,42	2,68	0,00040
<i>Cadm1</i>	1,42	2,68	0,00001
<i>Trim25</i>	1,42	2,68	0,00080



ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Mfsd12</i>	1,42	2,67	0,00020
<i>Med11</i>	1,42	2,67	0,00090
<i>Mrpl57</i>	1,42	2,67	0,00110
<i>Gm4070; Gvin1; Gm17757; Gm18853</i>	1,41	2,66	0,00002
<i>Cox6b1</i>	1,41	2,65	0,00060
<i>Ifih1</i>	1,40	2,64	0,00010
<i>Use1</i>	1,40	2,64	0,00210
<i>Svbp</i>	1,40	2,63	0,00050
<i>Rpl22</i>	1,40	2,63	0,00000
<i>Colgalt1</i>	1,39	2,62	0,00006
<i>Rhbd2</i>	1,39	2,62	0,00020
<i>Cd180</i>	1,39	2,62	0,00020
<i>Mrpl20</i>	1,38	2,61	0,00020
<i>Rpl32</i>	1,38	2,61	0,00001
<i>Gvin1</i>	1,38	2,61	0,00009
<i>St14</i>	1,38	2,61	0,00030
<i>Gcnt2</i>	1,38	2,61	0,00080
<i>Sh3bgrl3</i>	1,38	2,6	0,00030
<i>Rps5</i>	1,38	2,6	0,00001
<i>Chst11</i>	1,38	2,6	0,00240
<i>Cd84</i>	1,37	2,59	0,00000
<i>Apoc1</i>	1,37	2,59	0,00040
<i>2810428115Rik</i>	1,37	2,59	0,00130
<i>Rpl13; Snord68; Mir7079</i>	1,37	2,58	0,00020
<i>Txndc17</i>	1,36	2,57	0,00030
<i>Aprt</i>	1,36	2,56	0,00080
<i>Gm5848</i>	1,35	2,55	0,00009
<i>Pet100</i>	1,35	2,55	0,00002
<i>Lipa</i>	1,35	2,55	0,00190
<i>Slamf8</i>	1,34	2,53	0,00050
<i>Eif3f</i>	1,34	2,53	0,00150
<i>Rp9</i>	1,34	2,53	0,00020
<i>Prrg1</i>	1,34	2,53	0,00060
<i>Gm11808</i>	1,33	2,52	0,00005
<i>Fem1b</i>	1,33	2,52	0,00010
<i>Lgals1</i>	1,33	2,52	0,00020
<i>Creg1</i>	1,33	2,51	0,00020
<i>Tomm7</i>	1,33	2,51	0,00020
<i>Mitf</i>	1,33	2,51	0,00100
<i>Rps13</i>	1,33	2,51	0,00280
<i>Mthfsl</i>	1,33	2,51	0,00040



## ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>AW112010</i>	1,32	2,5	0,00009
<i>Pycard</i>	1,32	2,49	0,00110
<i>H2afj</i>	1,31	2,48	0,00190
<i>Ctla2a</i>	1,31	2,48	0,00080
<i>Eif4ebp1</i>	1,30	2,47	0,00040
<i>Ubl5</i>	1,30	2,47	0,00020
<i>Mrpl52</i>	1,30	2,47	0,00010
<i>Dusp5</i>	1,30	2,47	0,00040
<i>Nap111</i>	1,30	2,46	0,00009
<i>Six1</i>	1,30	2,46	0,00020
<i>Rpl11</i>	1,29	2,45	0,00230
<i>Uqcr11</i>	1,29	2,45	0,00008
<i>Cpq</i>	1,29	2,45	0,00050
<i>H2-Q1</i>	1,29	2,45	0,00050
<i>Ndufb5</i>	1,29	2,44	0,00020
<i>Cxcl9</i>	1,29	2,44	0,00100
<i>Elmod1</i>	1,29	2,44	0,00280
<i>Cox7a2</i>	1,29	2,44	0,00010
<i>2210013021Rik</i>	1,29	2,44	0,00070
<i>Spryd7</i>	1,29	2,44	0,00240
<i>Hacd2</i>	1,29	2,44	0,00003
<i>Gm4955</i>	1,28	2,43	0,00130
<i>Ift22</i>	1,28	2,43	0,00060
<i>Acer3</i>	1,28	2,43	0,00140
<i>Maff</i>	1,28	2,43	0,00030
<i>Csnk2b</i>	1,28	2,43	0,00030
<i>C920025E04Rik</i>	1,28	2,43	0,00001
<i>Smim14</i>	1,28	2,42	0,00020
<i>Dtnbp1</i>	1,28	2,42	0,00130
<i>Gm19399</i>	1,28	2,42	0,00006
<i>C4a</i>	1,28	2,42	0,00060
<i>Atp5g3</i>	1,27	2,41	0,00030
<i>Tnfsf8</i>	1,27	2,41	0,00010
<i>Shfm1</i>	1,27	2,41	0,00009
<i>C4b</i>	1,27	2,41	0,00130
<i>Rpl29</i>	1,26	2,4	0,00006
<i>1500011K16Rik</i>	1,26	2,4	0,00110
<i>Gm13841; Rpl29</i>	1,26	2,4	0,00006
<i>Anxa4</i>	1,26	2,4	0,00160
<i>Banf1</i>	1,26	2,4	0,00005
<i>Taf10</i>	1,26	2,39	0,00006



ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Setx</i>	1,25	2,38	0,00160
<i>Ube2l6</i>	1,25	2,38	0,00270
<i>Tyrobp</i>	1,25	2,38	0,00004
<i>Sin3b</i>	1,25	2,38	0,00180
<i>Snap29</i>	1,25	2,38	0,00140
<i>Nop10</i>	1,24	2,37	0,00190
<i>Serf2</i>	1,24	2,37	0,00040
<i>Defb46</i>	1,24	2,37	0,00230
<i>Mrpl34</i>	1,24	2,37	0,00020
<i>Tgif1</i>	1,24	2,37	0,00070
<i>Ppfia4</i>	1,24	2,36	0,00150
<i>Tpm4</i>	1,24	2,36	0,00070
<i>Csf2ra</i>	1,24	2,36	0,00004
<i>Cdk18</i>	1,23	2,35	0,00010
<i>Psm5</i>	1,23	2,35	0,00020
<i>Ngfrap1</i>	1,23	2,35	0,00250
<i>Rps15</i>	1,23	2,35	0,00050
<i>Rpl34; Rpl34-ps1</i>	1,23	2,34	0,00020
<i>Snrpd2</i>	1,23	2,34	0,00007
<i>Pld3</i>	1,23	2,34	0,00005
<i>Atp5j</i>	1,23	2,34	0,00008
<i>Rps8; Snord38a</i>	1,22	2,33	0,00020
<i>Fam162a</i>	1,22	2,33	0,00030
<i>Ndufb3</i>	1,21	2,31	0,00230
<i>Mdh2</i>	1,21	2,31	0,00120
<i>Akt3</i>	1,20	2,3	0,00110
<i>S100a1</i>	1,20	2,3	0,00270
<i>Rps19</i>	1,20	2,3	0,00007
<i>Rab20</i>	1,20	2,3	0,00070
<i>Rpl38</i>	1,20	2,3	0,00004
<i>Atp5g1</i>	1,20	2,3	0,00009
<i>Hpcal1</i>	1,20	2,3	0,00040
<i>Atp6v1c1</i>	1,20	2,3	0,00110
<i>Bcl2l1</i>	1,20	2,29	0,00130
<i>Actr3b</i>	1,20	2,29	0,00140
<i>Rassf3</i>	1,20	2,29	0,00040
<i>Pigp</i>	1,20	2,29	0,00110
<i>Gm4832</i>	1,20	2,29	0,00006
<i>Slc2a1</i>	1,19	2,28	0,00070
<i>Irf8</i>	1,19	2,28	0,00250
<i>2700060E02Rik</i>	1,19	2,28	0,00040



## ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Fau</i>	1,19	2,28	0,00050
<i>Tor3a</i>	1,18	2,27	0,00090
<i>Mir692-3; Ftl1; Ftl2-ps</i>	1,18	2,27	0,00070
<i>Xylt1</i>	1,18	2,27	0,00009
<i>Gabre</i>	1,18	2,27	0,00060
<i>Atp5g2</i>	1,18	2,27	0,00080
<i>Ndufa11</i>	1,18	2,27	0,00120
<i>Snrpe</i>	1,18	2,26	0,00001
<i>Naa20</i>	1,18	2,26	0,00110
<i>Rasgef1b</i>	1,18	2,26	0,00120
<i>Prkch</i>	1,18	2,26	0,00250
<i>Plpp1</i>	1,18	2,26	0,00050
<i>Cd22</i>	1,17	2,25	0,00020
<i>Cotl1</i>	1,17	2,25	0,00040
<i>Mthfs</i>	1,17	2,25	0,00140
<i>Tmsb4x</i>	1,17	2,25	0,00050
<i>Ndufb8</i>	1,17	2,25	0,00150
<i>Slc11a1</i>	1,16	2,24	0,00040
<i>Fcer1g</i>	1,16	2,24	0,00020
<i>BC028528</i>	1,16	2,24	0,00002
<i>Hexa</i>	1,16	2,24	0,00040
<i>Mien1</i>	1,16	2,24	0,00050
<i>Rps28</i>	1,16	2,24	0,00090
<i>Stk19</i>	1,16	2,24	0,00040
<i>Tmem189</i>	1,16	2,23	0,00020
<i>Mrps21</i>	1,16	2,23	0,00170
<i>Eno1; Eno1b</i>	1,16	2,23	0,00280
<i>Cox7b</i>	1,16	2,23	0,00010
<i>Btf3</i>	1,16	2,23	0,00020
<i>Syng1</i>	1,16	2,23	0,00040
<i>Cox7a2l</i>	1,16	2,23	0,00220
<i>H2-DMb1</i>	1,16	2,23	0,00060
<i>Fmn1</i>	1,14	2,21	0,00030
<i>Malt1</i>	1,14	2,21	0,00020
<i>Prune2</i>	1,14	2,21	0,00010
<i>Dynlt3</i>	1,14	2,2	0,00250
<i>Fam26f</i>	1,14	2,2	0,00180
<i>Uqcr10</i>	1,14	2,2	0,00110
<i>Mrpl17</i>	1,13	2,19	0,00210
<i>Rps27rt</i>	1,13	2,19	0,00050
<i>Llph</i>	1,13	2,19	0,00040



ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Gm8909</i>	1,13	2,19	0,00040
<i>Atp5e</i>	1,12	2,18	0,00020
<i>Noct</i>	1,12	2,18	0,00100
<i>Pdgfa</i>	1,12	2,18	0,00003
<i>Psmb9</i>	1,12	2,18	0,00250
<i>Oasl2</i>	1,12	2,17	0,00100
<i>Gm1966</i>	1,12	2,17	0,00090
<i>Mcemp1</i>	1,12	2,17	0,00230
<i>Txn1</i>	1,11	2,16	0,00004
<i>Megf9</i>	1,11	2,16	0,00020
<i>Ctsc</i>	1,11	2,16	0,00110
<i>Nol12</i>	1,11	2,16	0,00230
<i>Ndufc1</i>	1,10	2,15	0,00040
<i>Slc6a17</i>	1,10	2,15	0,00020
<i>Aldh2</i>	1,10	2,15	0,00030
<i>2310036022Rik</i>	1,10	2,15	0,00160
<i>Mt1</i>	1,10	2,15	0,00004
<i>Prkcsb</i>	1,10	2,15	0,00250
<i>Ly86</i>	1,10	2,15	0,00010
<i>Tmem154</i>	1,10	2,14	0,00210
<i>Polr2j</i>	1,10	2,14	0,00220
<i>Ndufa13</i>	1,10	2,14	0,00040
<i>Med10</i>	1,10	2,14	0,00150
<i>Csf2rb2; Mir7676-1; Mir7676-2</i>	1,10	2,14	0,00240
<i>Trem2</i>	1,10	2,14	0,00020
<i>Pilra</i>	1,09	2,13	0,00040
<i>sep-09</i>	1,09	2,13	0,00130
<i>Ctsb</i>	1,09	2,13	0,00005
<i>Ndufa1</i>	1,08	2,12	0,00005
<i>Rpl27</i>	1,08	2,12	0,00003
<i>Rpl24; Zbtb11</i>	1,08	2,12	0,00003
<i>March3</i>	1,08	2,12	0,00120
<i>Ifitm2</i>	1,08	2,11	0,00090
<i>Nme1</i>	1,08	2,11	0,00060
<i>Churc1</i>	1,08	2,11	0,00020
<i>Dpy19l4</i>	1,07	2,1	0,00010
<i>Chst2</i>	1,06	2,09	0,00240
<i>C1galt1c1</i>	1,06	2,09	0,00090
<i>Hist1h2bc</i>	1,06	2,09	0,00090
<i>Gm5093</i>	1,06	2,09	0,00040
<i>Rasa4; Mir7035</i>	1,06	2,08	0,00030





## ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Tmco3</i>	1,06	2,08	0,00110
<i>Nme2</i>	1,06	2,08	0,00002
<i>Tctex1d2</i>	1,06	2,08	0,00003
<i>Prdx1</i>	1,05	2,07	0,00040
<i>Gins2</i>	1,05	2,07	0,00240
<i>Vps13c</i>	1,05	2,07	0,00210
<i>Sf3b5</i>	1,05	2,07	0,00090
<i>Cd300lb</i>	1,05	2,07	0,00220
<i>Pf3dn5</i>	1,05	2,07	0,00140
<i>Rcan1</i>	1,05	2,07	0,00230
<i>Gm2000</i>	1,04	2,06	0,00210
<i>Serpine2</i>	1,04	2,06	0,00190
<i>Cox5a</i>	1,04	2,06	0,00020
<i>L1cam</i>	1,04	2,06	0,00100
<i>Nenf</i>	1,04	2,05	0,00050
<i>Vcam1</i>	1,04	2,05	0,00120
<i>Gm6988</i>	1,04	2,05	0,00010
<i>Gsto1</i>	1,04	2,05	0,00160
<i>Cyba</i>	1,03	2,04	0,00090
<i>Nab2</i>	1,03	2,04	0,00020
<i>Iah1</i>	1,03	2,04	0,00040
<i>LOC102641600; Gm11273</i>	1,03	2,04	0,00010
<i>Eef1d</i>	1,03	2,04	0,00100
<i>Rwdd1</i>	1,02	2,03	0,00180
<i>Ten1</i>	1,02	2,03	0,00080
<i>Il1rl1</i>	1,01	2,02	0,00060
<i>Ctdnep1</i>	1,01	2,02	0,00170
<i>Gm6109</i>	1,01	2,02	0,00130
<i>Ptms</i>	1,01	2,01	0,00140
<i>Rps11</i>	1,00	2	0,00010
<i>Lamp1</i>	1,00	2	0,00040
<i>Nrp1; Mir1903</i>	1,00	2	0,00030
<i>Dap</i>	1,00	2	0,00040
<i>Txn2</i>	1,00	2	0,00150
<i>Srp14</i>	0,99	1,99	0,00140
<i>Lap3</i>	0,99	1,99	0,00060
<i>Smco4</i>	0,99	1,99	0,00090
<i>Myo1g</i>	0,99	1,99	0,00020
<i>Spata9</i>	0,99	1,99	0,00040
<i>Ramp1</i>	0,99	1,98	0,00009
<i>Degs1</i>	0,99	1,98	0,00120



ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Cnpy2</i>	0,99	1,98	0,00030
<i>Abrac1</i>	0,99	1,98	0,00006
<i>Gpr137b-ps</i>	0,99	1,98	0,00270
<i>Trem12</i>	0,99	1,98	0,00030
<i>Hax1</i>	0,98	1,97	0,00180
<i>Rarres2</i>	0,98	1,97	0,00230
<i>Gm6654</i>	0,98	1,97	0,00060
<i>Galnt7</i>	0,98	1,97	0,00100
<i>Rps27l</i>	0,98	1,97	0,00006
<i>Ctsh</i>	0,98	1,97	0,00050
<i>Madcam1</i>	0,98	1,97	0,00030
<i>Zmynd15</i>	0,98	1,97	0,00060
<i>Gm3839</i>	0,98	1,97	0,00020
<i>Mrps28</i>	0,97	1,96	0,00260
<i>Hsd17b10</i>	0,97	1,96	0,00120
<i>Gpr132</i>	0,97	1,96	0,00200
<i>Tpt1</i>	0,97	1,96	0,00120
<i>Fgl2</i>	0,96	1,95	0,00070
<i>Hebp1</i>	0,96	1,95	0,00050
<i>Rpl18</i>	0,96	1,95	0,00280
<i>Tmsb15b2; Tmsb15b1; Tmsb15l</i>	0,96	1,95	0,00040
<i>Rps26</i>	0,96	1,94	0,00060
<i>Smim4</i>	0,96	1,94	0,00150
<i>Dnajc15</i>	0,96	1,94	0,00230
<i>Oxct1</i>	0,96	1,94	0,00020
<i>Pabpc1</i>	0,96	1,94	0,00240
<i>Eef1g</i>	0,96	1,94	0,00160
<i>Spats2l</i>	0,95	1,93	0,00120
<i>Bloc1s1</i>	0,95	1,93	0,00090
<i>Mrpl11</i>	0,95	1,93	0,00250
<i>Dusp2</i>	0,94	1,92	0,00110
<i>Gng5</i>	0,94	1,92	0,00230
<i>Tbc1d1</i>	0,94	1,92	0,00030
<i>Bri3bp</i>	0,94	1,92	0,00070
<i>Tmem205</i>	0,94	1,92	0,00060
<i>Tma7</i>	0,94	1,92	0,00120
<i>Cxx1c</i>	0,94	1,92	0,00060
<i>Mrpl54</i>	0,94	1,92	0,00150
<i>Os9</i>	0,94	1,92	0,00270
<i>Sh3pxd2b</i>	0,94	1,92	0,00090
<i>Slirp</i>	0,94	1,92	0,00020



## ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Eif3e</i>	0,94	1,92	0,00040
<i>F830016B08Rik</i>	0,94	1,92	0,00020
<i>Tmem160</i>	0,93	1,91	0,00060
<i>Sdf2</i>	0,93	1,91	0,00200
<i>Gm5481</i>	0,93	1,91	0,00050
<i>Bak1</i>	0,93	1,91	0,00120
<i>Prelid2</i>	0,93	1,91	0,00070
<i>Usmg5</i>	0,93	1,91	0,00210
<i>Aimp1</i>	0,93	1,9	0,00160
<i>C1qc</i>	0,93	1,9	0,00060
<i>Rpl28</i>	0,93	1,9	0,00030
<i>Rpl36</i>	0,93	1,9	0,00040
<i>Rps18</i>	0,93	1,9	0,00020
<i>Speg</i>	0,92	1,89	0,00160
<i>Rpl35</i>	0,92	1,89	0,00050
<i>Rpl15</i>	0,92	1,89	0,00140
<i>Psme2</i>	0,92	1,89	0,00020
<i>Ndufa2</i>	0,92	1,89	0,00140
<i>S100a13</i>	0,91	1,88	0,00070
<i>2700029M09Rik</i>	0,91	1,88	0,00090
<i>Siva1</i>	0,91	1,88	0,00060
<i>Ube2e1</i>	0,91	1,88	0,00230
<i>Chwd1</i>	0,91	1,88	0,00160
<i>Rps20</i>	0,90	1,87	0,00080
<i>Tpst1</i>	0,90	1,87	0,00070
<i>Gm4581</i>	0,90	1,87	0,00170
<i>Ppib</i>	0,90	1,86	0,00190
<i>Dram1</i>	0,90	1,86	0,00130
<i>Cd5</i>	0,90	1,86	0,00030
<i>C1qb</i>	0,89	1,85	0,00180
<i>Rps6ka3</i>	0,89	1,85	0,00220
<i>Trdn</i>	0,89	1,85	0,00150
<i>Chchd1</i>	0,89	1,85	0,00070
<i>Tmem254b; Tmem254c; Tmem254a</i>	0,89	1,85	0,00120
<i>Cuedc2</i>	0,89	1,85	0,00240
<i>Rpl7a</i>	0,88	1,84	0,00220
<i>Alpk1</i>	0,88	1,84	0,00180
<i>Hmgn3</i>	0,88	1,84	0,00220
<i>Wbp5</i>	0,88	1,84	0,00270
<i>Il3ra</i>	0,88	1,84	0,00100
<i>Tomm6; Prickle4</i>	0,88	1,84	0,00130



ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Rev3l</i>	0,87	1,83	0,00130
<i>Xaf1</i>	0,87	1,83	0,00180
<i>Atpif1</i>	0,86	1,82	0,00020
<i>Tbca</i>	0,86	1,82	0,00090
<i>Gm7030</i>	0,86	1,82	0,00040
<i>B2m</i>	0,86	1,81	0,00040
<i>Tmem9</i>	0,85	1,8	0,00250
<i>Anp32b</i>	0,85	1,8	0,00170
<i>Fuca1</i>	0,85	1,8	0,00070
<i>Aym1</i>	0,85	1,8	0,00030
<i>Bcl2a1b; Bcl2a1a</i>	0,85	1,8	0,00050
<i>Nup62cl</i>	0,85	1,8	0,00170
<i>Lsm7</i>	0,85	1,8	0,00190
<i>Ict1</i>	0,85	1,8	0,00110
<i>2010107E04Rik</i>	0,85	1,8	0,00030
<i>Tmem254c; Tmem254a</i>	0,85	1,8	0,00250
<i>Masp1</i>	0,85	1,8	0,00180
<i>Tap1</i>	0,85	1,8	0,00120
<i>Runx2</i>	0,85	1,8	0,00130
<i>Ndufb6</i>	0,84	1,79	0,00100
<i>Kxd1</i>	0,84	1,79	0,00070
<i>Tfap2c</i>	0,83	1,78	0,00130
<i>Etv3</i>	0,83	1,78	0,00270
<i>Olfm4</i>	0,83	1,78	0,00110
<i>Hypk</i>	0,82	1,77	0,00110
<i>Aebp2</i>	0,82	1,77	0,00100
<i>Map4k1</i>	0,82	1,77	0,00270
<i>Mrpl42</i>	0,82	1,77	0,00090
<i>Cd83</i>	0,82	1,77	0,00050
<i>Pkmyt1</i>	0,82	1,77	0,00050
<i>2610524H06Rik</i>	0,82	1,76	0,00130
<i>Gm5617</i>	0,81	1,75	0,00240
<i>Cited2</i>	0,81	1,75	0,00110
<i>Ctsl</i>	0,81	1,75	0,00080
<i>Clec5a</i>	0,80	1,74	0,00130
<i>Atp2b1</i>	0,80	1,74	0,00210
<i>Pemt</i>	0,80	1,74	0,00190
<i>Tmem261</i>	0,79	1,73	0,00090
<i>Arhgap26</i>	0,79	1,73	0,00210
<i>Cacfd1</i>	0,77	1,71	0,00070
<i>Strc</i>	0,77	1,71	0,00090



## ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Tspan17</i>	0,77	1,7	0,00270
<i>Trps1; Mir1907</i>	0,77	1,7	0,00080
<i>Asph</i>	0,76	1,69	0,00130
<i>Aqp3</i>	0,76	1,69	0,00230
<i>Rpl9</i>	0,76	1,69	0,00160
<i>Rpl14; Rpl14-ps1</i>	0,76	1,69	0,00150
<i>9930022D16Rik</i>	0,76	1,69	0,00080
<i>Ak5</i>	0,75	1,68	0,00080
<i>Arhgap25</i>	0,75	1,68	0,00270
<i>Rpsa</i>	0,75	1,68	0,00050
<i>Gm2174</i>	0,75	1,68	0,00100
<i>Dek</i>	0,75	1,68	0,00030
<i>Gtf2h5</i>	0,75	1,68	0,00160
<i>Gm13213</i>	0,75	1,68	0,00070
<i>Cox5b</i>	0,74	1,67	0,00190
<i>Slc2a6</i>	0,74	1,67	0,00180
<i>Rpl4</i>	0,74	1,67	0,00230
<i>Gnptg</i>	0,74	1,67	0,00150
<i>Rps14</i>	0,74	1,67	0,00110
<i>Angptl3</i>	0,73	1,66	0,00240
<i>Rpl5</i>	0,73	1,66	0,00260
<i>Mrpl43</i>	0,73	1,66	0,00120
<i>Erich2</i>	0,72	1,65	0,00140
<i>Gm13212</i>	0,72	1,65	0,00040
<i>Snrpg</i>	0,72	1,65	0,00030
<i>Uba52</i>	0,72	1,65	0,00260
<i>Akap5</i>	0,72	1,65	0,00080
<i>Rpl6</i>	0,71	1,64	0,00140
<i>Tspan33</i>	0,71	1,64	0,00060
<i>Serf1</i>	0,71	1,64	0,00190
<i>Ndufs4</i>	0,71	1,64	0,00190
<i>Txnrd2</i>	0,71	1,64	0,00090
<i>Npm1</i>	0,70	1,63	0,00110
<i>Ndufa8</i>	0,70	1,62	0,00110
<i>Dusp15</i>	0,70	1,62	0,00070
<i>Ndufs5</i>	0,70	1,62	0,00080
<i>Mrpl51</i>	0,70	1,62	0,00200
<i>Fam3c</i>	0,70	1,62	0,00120
<i>Gm614</i>	0,70	1,62	0,00060
<i>Panx2</i>	0,70	1,62	0,00220
<i>Rps4x</i>	0,69	1,61	0,00240



ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Nedd8</i>	0,69	1,61	0,00170
<i>Mx1</i>	0,69	1,61	0,00260
<i>Chst9</i>	0,69	1,61	0,00200
<i>Vmn1r47</i>	0,68	1,6	0,00240
<i>Nedd9</i>	0,68	1,6	0,00210
<i>Ccdc163</i>	0,67	1,59	0,00260
<i>Rbm47</i>	0,67	1,59	0,00120
<i>Rpl18a</i>	0,67	1,59	0,00230
<i>Fscn3</i>	0,66	1,58	0,00140
<i>Gapdh</i>	0,66	1,58	0,00260
<i>Rnf121</i>	0,66	1,58	0,00160
<i>1810011010Rik</i>	0,66	1,58	0,00170
<i>Rnf26</i>	0,66	1,58	0,00160
<i>Psme2b</i>	0,66	1,58	0,00260
<i>Gm3837</i>	0,65	1,57	0,00230
<i>Rpl21</i>	0,65	1,57	0,00130
<i>Ifitm1</i>	0,65	1,57	0,00220
<i>Cox17</i>	0,65	1,57	0,00210
<i>Atp5h</i>	0,64	1,56	0,00120
<i>Ybx1</i>	0,62	1,54	0,00260
<i>Tuba8</i>	0,60	1,52	0,00250
<i>Cdh10</i>	0,60	1,52	0,00250
<i>Baiap2</i>	0,59	1,51	0,00180
<i>Nsa2</i>	0,59	1,51	0,00210
<i>Nadk</i>	0,58	1,5	0,00240
<i>Mbd2</i>	0,58	1,5	0,00270
<i>Gm9493</i>	0,58	1,5	0,00270
<i>Rpl41</i>	0,57	1,48	0,00170
<i>Fam69c</i>	0,57	1,48	0,00270
<i>Cnih1</i>	0,54	1,45	0,00210
<i>Lrfr3</i>	0,51	1,42	0,00260
<i>Plekho1</i>	-0,58	-1,49	0,00260
<i>Tgfbra1</i>	-0,59	-1,51	0,00240
<i>Endov</i>	-0,60	-1,52	0,00210
<i>Epc2</i>	-0,61	-1,53	0,00240
<i>Bend5</i>	-0,61	-1,53	0,00280
<i>6330408A02Rik</i>	-0,62	-1,54	0,00200
<i>Scamp5</i>	-0,64	-1,56	0,00180
<i>Ddx5; Mir3064</i>	-0,64	-1,56	0,00190
<i>6030468B19Rik</i>	-0,65	-1,57	0,00210
<i>Afmid</i>	-0,65	-1,57	0,00220



## ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Nudt13</i>	-0,65	-1,57	0,00210
<i>Impg2</i>	-0,65	-1,57	0,00190
<i>Ptger3</i>	-0,66	-1,58	0,00240
<i>Stxbp3</i>	-0,66	-1,58	0,00160
<i>Acy1</i>	-0,66	-1,58	0,00180
<i>Ip6k1</i>	-0,66	-1,58	0,00150
<i>Tle2</i>	-0,66	-1,58	0,00210
<i>Cep78</i>	-0,66	-1,58	0,00120
<i>Cysltr1</i>	-0,68	-1,6	0,00130
<i>Zbth39</i>	-0,68	-1,6	0,00230
<i>Csf1r</i>	-0,68	-1,6	0,00090
<i>Slc22a15</i>	-0,69	-1,61	0,00210
<i>Zfp78</i>	-0,69	-1,61	0,00160
<i>Zfp287</i>	-0,69	-1,61	0,00140
<i>Atl2</i>	-0,69	-1,61	0,00270
<i>Pik3c3</i>	-0,69	-1,61	0,00270
<i>Stx2</i>	-0,70	-1,63	0,00160
<i>Notch2</i>	-0,71	-1,64	0,00240
<i>L3mbtl3</i>	-0,71	-1,64	0,00190
<i>Qk</i>	-0,71	-1,64	0,00190
<i>Cebpd</i>	-0,72	-1,65	0,00170
<i>Vsig10l</i>	-0,72	-1,65	0,00160
<i>Stk17b</i>	-0,74	-1,67	0,00270
<i>Rasgrf2</i>	-0,74	-1,67	0,00220
<i>Lmbr11</i>	-0,74	-1,67	0,00120
<i>Ptp4a1; Gm13363</i>	-0,75	-1,68	0,00150
<i>Ccbl2</i>	-0,75	-1,68	0,00210
<i>Usp2</i>	-0,75	-1,68	0,00130
<i>B4galt4</i>	-0,75	-1,68	0,00210
<i>Ssbp3</i>	-0,76	-1,69	0,00120
<i>Mycbp</i>	-0,76	-1,69	0,00030
<i>Pik3c2a</i>	-0,76	-1,69	0,00060
<i>Iffo1</i>	-0,77	-1,7	0,00100
<i>2610021A01Rik</i>	-0,77	-1,7	0,00150
<i>Clcn3</i>	-0,77	-1,7	0,00170
<i>Acad11</i>	-0,77	-1,7	0,00110
<i>Gm10778</i>	-0,77	-1,7	0,00140
<i>Gm10778</i>	-0,77	-1,7	0,00140
<i>Brd2</i>	-0,77	-1,7	0,00070
<i>Impact</i>	-0,77	-1,7	0,00180
<i>Lbr</i>	-0,77	-1,71	0,00210



ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Znrf1</i>	-0,77	-1,71	0,00090
<i>Gm6568</i>	-0,77	-1,71	0,00190
<i>A930033H14Rik</i>	-0,77	-1,71	0,00090
<i>Tle4</i>	-0,77	-1,71	0,00140
<i>S100a10</i>	-0,78	-1,72	0,00050
<i>Txnrd3</i>	-0,78	-1,72	0,00120
<i>Siglech</i>	-0,78	-1,72	0,00040
<i>Picalm</i>	-0,78	-1,72	0,00220
<i>Stard8</i>	-0,78	-1,72	0,00080
<i>Ptar1</i>	-0,78	-1,72	0,00090
<i>Rhoh</i>	-0,79	-1,73	0,00180
<i>4732471J01Rik</i>	-0,79	-1,73	0,00150
<i>Gm3264</i>	-0,79	-1,73	0,00160
<i>Setbp1</i>	-0,79	-1,73	0,00050
<i>Bsdc1</i>	-0,80	-1,74	0,00210
<i>Zfp143</i>	-0,80	-1,74	0,00280
<i>Zfp62</i>	-0,80	-1,74	0,00250
<i>Nlrp1b</i>	-0,80	-1,74	0,00050
<i>Tbp</i>	-0,80	-1,74	0,00050
<i>Thada</i>	-0,80	-1,74	0,00150
<i>Mybl2</i>	-0,81	-1,75	0,00270
<i>Zfp846</i>	-0,81	-1,75	0,00110
<i>Vezf1</i>	-0,81	-1,75	0,00090
<i>Itsn2</i>	-0,81	-1,75	0,00200
<i>Tnfrsf12a</i>	-0,81	-1,75	0,00230
<i>Fam45a</i>	-0,81	-1,75	0,00170
<i>Pdlim5</i>	-0,82	-1,76	0,00120
<i>Srrm1</i>	-0,82	-1,76	0,00130
<i>Lrcoil1</i>	-0,82	-1,76	0,00230
<i>Mllt10</i>	-0,82	-1,77	0,00260
<i>Gm3468</i>	-0,82	-1,77	0,00140
<i>Mon2</i>	-0,83	-1,78	0,00170
<i>Vrk1</i>	-0,83	-1,78	0,00260
<i>Ncoa4</i>	-0,83	-1,78	0,00160
<i>Hpgds</i>	-0,84	-1,79	0,00040
<i>Vapa</i>	-0,84	-1,79	0,00130
<i>Trp53i11</i>	-0,85	-1,8	0,00110
<i>Alox5ap</i>	-0,85	-1,8	0,00030
<i>Zfp398</i>	-0,85	-1,8	0,00220
<i>Dnm2</i>	-0,85	-1,8	0,00270
<i>Ankrd44</i>	-0,86	-1,81	0,00220





## ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Skil</i>	-0,86	-1,81	0,00080
<b>6820431F20Rik; 2610005L07Rik</b>	-0,86	-1,81	0,00030
<i>Mpi</i>	-0,86	-1,81	0,00050
<i>Adgre4</i>	-0,86	-1,81	0,00080
<i>Rnf2</i>	-0,86	-1,82	0,00210
<i>Atf3</i>	-0,86	-1,82	0,00140
<i>Zfp953</i>	-0,86	-1,82	0,00080
<i>C5ar2</i>	-0,87	-1,83	0,00060
<i>Trim36</i>	-0,87	-1,83	0,00060
<i>Suv420h1</i>	-0,87	-1,83	0,00070
<i>Gm7694</i>	-0,88	-1,84	0,00140
<b>2610005L07Rik</b>	-0,88	-1,84	0,00030
<i>Fli1</i>	-0,88	-1,84	0,00260
<i>Hlf</i>	-0,88	-1,84	0,00040
<i>Tmem173</i>	-0,88	-1,84	0,00040
<i>Hist2h2ac</i>	-0,89	-1,85	0,00060
<i>Mef2a</i>	-0,89	-1,85	0,00050
<i>Ppan</i>	-0,89	-1,85	0,00240
<i>Tysnd1</i>	-0,89	-1,85	0,00070
<i>Clk1</i>	-0,90	-1,86	0,00060
<b>Zbed6; Zc3h11a</b>	-0,90	-1,86	0,00260
<i>Exoc6b</i>	-0,90	-1,86	0,00080
<i>Lrrc56</i>	-0,90	-1,86	0,00140
<i>Zfp236</i>	-0,90	-1,86	0,00250
<i>Bmp2k</i>	-0,90	-1,87	0,00190
<i>Dusp11</i>	-0,90	-1,87	0,00020
<i>Arhgef6</i>	-0,90	-1,87	0,00090
<i>Pum2</i>	-0,90	-1,87	0,00100
<i>Calm2</i>	-0,90	-1,87	0,00260
<i>Inpp5d</i>	-0,91	-1,88	0,00070
<i>Col27a1</i>	-0,91	-1,88	0,00010
<i>Phf14</i>	-0,91	-1,88	0,00040
<b>Fam210a; Mir7219</b>	-0,91	-1,88	0,00150
<i>Kmt2e</i>	-0,92	-1,89	0,00070
<i>Usp42</i>	-0,92	-1,89	0,00090
<b>1810011H11Rik</b>	-0,92	-1,89	0,00230
<b>Ang; Rnase4</b>	-0,92	-1,89	0,00010
<i>Serinc1</i>	-0,93	-1,9	0,00230
<i>Sla</i>	-0,93	-1,9	0,00060
<i>Tra2b</i>	-0,93	-1,9	0,00020
<i>Wac</i>	-0,93	-1,9	0,00260



ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Raf1</i>	-0,93	-1,91	0,00070
<i>Galnt16</i>	-0,93	-1,91	0,00110
<i>Jarid2</i>	-0,93	-1,91	0,00060
<i>Nsd1</i>	-0,93	-1,91	0,00220
<i>Mycbp2</i>	-0,93	-1,91	0,00260
<i>Taf8</i>	-0,93	-1,91	0,00060
<i>Lrig2</i>	-0,94	-1,92	0,00030
<i>Cryba4</i>	-0,94	-1,92	0,00060
<i>Zfp780b</i>	-0,94	-1,92	0,00030
<i>Dnajb9</i>	-0,94	-1,92	0,00060
<i>Map4k5</i>	-0,94	-1,92	0,00170
<i>Slc19a3</i>	-0,95	-1,93	0,00050
<i>Fgfr11</i>	-0,95	-1,93	0,00050
<i>Zscan18</i>	-0,95	-1,93	0,00130
<i>Cxcr6</i>	-0,95	-1,93	0,00020
<i>Tpp2</i>	-0,96	-1,94	0,00190
<i>Rbm39</i>	-0,96	-1,94	0,00020
<i>Tmem144</i>	-0,96	-1,94	0,00020
<i>RbmX</i>	-0,96	-1,94	0,00040
<i>Smurf2</i>	-0,96	-1,94	0,00050
<i>Son</i>	-0,96	-1,94	0,00040
<i>Mapk14</i>	-0,96	-1,94	0,00050
<i>Sall3</i>	-0,96	-1,94	0,00100
<i>Commd8</i>	-0,96	-1,95	0,00260
<i>Zfp748</i>	-0,96	-1,95	0,00240
<i>Slc25a37</i>	-0,96	-1,95	0,00050
<i>BC035044</i>	-0,97	-1,96	0,00210
<i>Gm18853</i>	-0,97	-1,96	0,00270
<i>Ewsr1</i>	-0,99	-1,98	0,00140
<i>Pip4k2a</i>	-0,99	-1,99	0,00010
<i>Ddx26b</i>	-0,99	-1,99	0,00120
<i>Srsf2</i>	-1,00	-2	0,00010
<i>Kcnrg</i>	-1,00	-2	0,00020
<i>Ier5</i>	-1,01	-2,01	0,00240
<i>Tanc2</i>	-1,01	-2,01	0,00120
<i>Hpgd</i>	-1,01	-2,02	0,00030
<i>Efnb2</i>	-1,01	-2,02	0,00250
<i>Tab2</i>	-1,01	-2,02	0,00020
<i>Srsf3</i>	-1,01	-2,02	0,00008
<i>Zcchc7</i>	-1,02	-2,03	0,00060
<i>Ctnnal1</i>	-1,02	-2,03	0,00080



## ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Selp1g</i>	-1,02	-2,03	0,00010
<i>Tmem170b</i>	-1,02	-2,03	0,00030
<i>Ppox</i>	-1,03	-2,04	0,00020
<i>Tlr3</i>	-1,03	-2,04	0,00050
<i>Slc36a1</i>	-1,03	-2,04	0,00070
<i>Scai</i>	-1,04	-2,05	0,00080
<i>Hist2h2aa1</i>	-1,04	-2,05	0,00005
<i>Hist2h2aa2</i>	-1,04	-2,05	0,00005
<i>Thrsp</i>	-1,04	-2,05	0,00080
<i>Lpcat2</i>	-1,04	-2,05	0,00030
<i>Myo18b</i>	-1,04	-2,06	0,00010
<i>Fam217a</i>	-1,04	-2,06	0,00100
<i>Nid2</i>	-1,04	-2,06	0,00020
<i>Btg2</i>	-1,05	-2,07	0,00060
<i>Tmem8c</i>	-1,05	-2,07	0,00120
<i>Lamtor3</i>	-1,05	-2,07	0,00160
<i>Clec4a2</i>	-1,05	-2,07	0,00160
<i>Fam13a</i>	-1,05	-2,07	0,00100
<i>Scoc</i>	-1,05	-2,07	0,00030
<i>Zkscan3</i>	-1,05	-2,07	0,00030
<i>Cttnbp2nl</i>	-1,06	-2,08	0,00090
<i>Nav2</i>	-1,06	-2,08	0,00240
<i>Gpr34</i>	-1,06	-2,08	0,00120
<i>Nuak1</i>	-1,06	-2,08	0,00120
<i>Egr1</i>	-1,06	-2,08	0,00020
<i>Gtf2i</i>	-1,06	-2,09	0,00010
<i>Phkg2</i>	-1,06	-2,09	0,00160
<i>Fgd3</i>	-1,06	-2,09	0,00050
<i>Gtf2h2</i>	-1,06	-2,09	0,00020
<i>Fgd2</i>	-1,06	-2,09	0,00130
<i>Zfyve9</i>	-1,07	-2,1	0,00020
<i>Retsat</i>	-1,07	-2,1	0,00100
<i>Slc10a1</i>	-1,07	-2,1	0,00030
<i>Dok3</i>	-1,07	-2,1	0,00070
<i>Pot1b</i>	-1,07	-2,1	0,00040
<i>Gpam</i>	-1,07	-2,1	0,00010
<i>Cep170</i>	-1,08	-2,11	0,00040
<i>Rere</i>	-1,08	-2,11	0,00020
<i>Chsy1</i>	-1,08	-2,11	0,00020
<i>March1</i>	-1,08	-2,11	0,00280
<i>Kif3c</i>	-1,08	-2,11	0,00100



ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Tnks2</i>	-1,08	-2,11	0,00040
<i>Snta1</i>	-1,09	-2,13	0,00050
<i>Rragc</i>	-1,09	-2,13	0,00110
<i>Sfpq</i>	-1,09	-2,13	0,00020
<i>Cd33</i>	-1,09	-2,13	0,00020
<i>Pnp2</i>	-1,09	-2,13	0,00060
<i>Slc37a4</i>	-1,10	-2,14	0,00170
<i>Gna15</i>	-1,10	-2,14	0,00020
<i>Ahsa2</i>	-1,10	-2,14	0,00170
<i>Susd3</i>	-1,10	-2,14	0,00090
<i>Tnfrsf17</i>	-1,10	-2,14	0,00230
<i>Fez2</i>	-1,10	-2,14	0,00070
<i>Gbp7</i>	-1,10	-2,15	0,00160
<i>Tm6sf1</i>	-1,10	-2,15	0,00010
<i>Mex3b</i>	-1,10	-2,15	0,00080
<i>Ceacam1</i>	-1,10	-2,15	0,00004
<i>Papd5</i>	-1,10	-2,15	0,00030
<i>Prps111</i>	-1,10	-2,15	0,00110
<i>Zfp69</i>	-1,11	-2,16	0,00030
<i>Pisd</i>	-1,11	-2,16	0,00050
<i>Anks3</i>	-1,11	-2,16	0,00010
<i>Pygm</i>	-1,11	-2,16	0,00050
<i>Abl1</i>	-1,12	-2,17	0,00190
<i>Zzz3</i>	-1,12	-2,18	0,00050
<i>Dock8</i>	-1,12	-2,18	0,00010
<i>Slc40a1</i>	-1,13	-2,19	0,00120
<i>Ubr3</i>	-1,13	-2,19	0,00030
<i>C030039L03Rik</i>	-1,13	-2,19	0,00280
<i>Gm3264</i>	-1,13	-2,19	0,00070
<i>S100a11</i>	-1,14	-2,2	0,00110
<i>Atp6v0a2</i>	-1,14	-2,2	0,00110
<i>Chst7</i>	-1,14	-2,2	0,00060
<i>Kctd12; Mir5130</i>	-1,14	-2,2	0,00070
<i>Tug1</i>	-1,14	-2,21	0,00190
<i>D15Ert621e</i>	-1,14	-2,21	0,00030
<i>Chd2; 1810026B05Rik</i>	-1,15	-2,22	0,00008
<i>Usp22</i>	-1,15	-2,22	0,00190
<i>Numb</i>	-1,15	-2,22	0,00040
<i>Zmym2</i>	-1,15	-2,22	0,00030
<i>Akap8l</i>	-1,15	-2,22	0,00140
<i>Ralgps2</i>	-1,16	-2,23	0,00005



## ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Acs11</i>	-1,16	-2,23	0,00220
<i>Prpsap2</i>	-1,16	-2,23	0,00020
<i>Plcg1</i>	-1,16	-2,24	0,00010
<i>Slc5a10</i>	-1,16	-2,24	0,00060
<i>Ypel5</i>	-1,16	-2,24	0,00003
<i>Tcf7l2</i>	-1,16	-2,24	0,00140
<i>Mettl21c</i>	-1,17	-2,25	0,00030
<i>Rgs3</i>	-1,17	-2,25	0,00100
<i>Pcf11</i>	-1,17	-2,25	0,00080
<i>Slc16a6</i>	-1,17	-2,25	0,00030
<i>Ambra1</i>	-1,18	-2,26	0,00003
<i>Erf</i>	-1,18	-2,26	0,00260
<i>Atf4</i>	-1,18	-2,26	0,00150
<i>Slc38a2</i>	-1,18	-2,26	0,00010
<i>Gabbr1</i>	-1,18	-2,26	0,00020
<i>Cacnb2</i>	-1,18	-2,27	0,00020
<i>Ldb1</i>	-1,18	-2,27	0,00090
<i>Gpr155</i>	-1,19	-2,28	0,00050
<i>Vps37b</i>	-1,19	-2,28	0,00030
<i>Itgam</i>	-1,19	-2,28	0,00005
<i>Abcc3</i>	-1,19	-2,28	0,00100
<i>Kansl1</i>	-1,19	-2,28	0,00009
<i>Siglece</i>	-1,20	-2,29	0,00130
<i>Jmjd1c</i>	-1,20	-2,29	0,00020
<i>Stab1</i>	-1,20	-2,29	0,00060
<i>Fam105a</i>	-1,20	-2,29	0,00010
<i>Ccnt2</i>	-1,20	-2,3	0,00010
<i>Tmc7</i>	-1,20	-2,3	0,00040
<i>Cmtm6</i>	-1,20	-2,3	0,00050
<i>Wsb1</i>	-1,20	-2,3	0,00020
<i>Abca9</i>	-1,20	-2,3	0,00080
<i>Snn</i>	-1,20	-2,3	0,00040
<i>Zbtb34</i>	-1,21	-2,31	0,00030
<i>Rsrp1</i>	-1,21	-2,31	0,00030
<i>Lcor</i>	-1,21	-2,31	0,00009
<i>Tubgcp5</i>	-1,21	-2,32	0,00030
<i>Klhl18</i>	-1,21	-2,32	0,00100
<i>Myliip</i>	-1,21	-2,32	0,00070
<i>Hspa5</i>	-1,22	-2,33	0,00007
<i>Tjp1</i>	-1,23	-2,34	0,00070
<i>Golm1</i>	-1,23	-2,34	0,00004



ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Tcf4</i>	-1,23	-2,34	0,00004
<i>Gm10392</i>	-1,23	-2,35	0,00070
<i>Arid3b</i>	-1,24	-2,36	0,00010
<i>Gab1</i>	-1,24	-2,37	0,00060
<i>Rnf167</i>	-1,24	-2,37	0,00050
<i>Midn</i>	-1,25	-2,38	0,00090
<i>Tspan13</i>	-1,26	-2,39	0,00030
<i>Actn1</i>	-1,26	-2,39	0,00120
<i>Cnot2</i>	-1,26	-2,4	0,00010
<i>Tbc1d9</i>	-1,27	-2,41	0,00270
<i>Dock4</i>	-1,27	-2,41	0,00050
<i>Mtmr10</i>	-1,28	-2,42	0,00120
<i>Dip2b</i>	-1,28	-2,42	0,00003
<i>Zdhhc14</i>	-1,28	-2,42	0,00040
<i>Casp8ap2</i>	-1,28	-2,43	0,00050
<i>Kcnd1</i>	-1,28	-2,43	0,00030
<i>Tmem55b</i>	-1,28	-2,43	0,00020
<i>Glul; Mir8114</i>	-1,29	-2,45	0,00010
<i>Ddit3</i>	-1,29	-2,45	0,00008
<i>Itpr1p1</i>	-1,30	-2,46	0,00020
<i>Gm2916</i>	-1,30	-2,47	0,00110
<i>Dock10</i>	-1,31	-2,48	0,00040
<i>Bid</i>	-1,31	-2,48	0,00020
<i>Zfp963; Zfp866</i>	-1,31	-2,48	0,00160
<i>Tagap</i>	-1,31	-2,48	0,00100
<i>Pten</i>	-1,31	-2,48	0,00005
<i>Nbeal1</i>	-1,32	-2,49	0,00060
<i>Csnk1d</i>	-1,32	-2,49	0,00060
<i>Hspa1b; Hspa1a</i>	-1,32	-2,49	0,00230
<i>Casp8</i>	-1,32	-2,5	0,00001
<i>Suv39h2</i>	-1,32	-2,5	0,00170
<i>Etv5</i>	-1,32	-2,5	0,00020
<i>Lyl1</i>	-1,33	-2,51	0,00009
<i>Prkab1</i>	-1,33	-2,52	0,00040
<i>Rhob</i>	-1,33	-2,52	0,00110
<i>Entpd1</i>	-1,34	-2,53	0,00004
<i>Spry1</i>	-1,34	-2,54	0,00020
<i>Ceacam2</i>	-1,34	-2,54	0,00010
<i>Klrd1</i>	-1,36	-2,56	0,00002
<i>Dusp6</i>	-1,36	-2,56	0,00060
<i>Gm3029</i>	-1,36	-2,56	0,00200



## ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Fry</i>	-1,36	-2,57	0,00001
<i>Rtn1</i>	-1,36	-2,57	0,00080
<i>Rbm5</i>	-1,37	-2,58	0,00090
<i>Adtrp</i>	-1,37	-2,59	0,00220
<i>1700110I01Rik</i>	-1,38	-2,61	0,00240
<i>Gm3558</i>	-1,38	-2,61	0,00010
<i>Grap</i>	-1,40	-2,63	0,00001
<i>Ecscr</i>	-1,40	-2,63	0,00002
<i>Slc26a11</i>	-1,41	-2,65	0,00130
<i>Pnp</i>	-1,41	-2,65	0,00020
<i>Slc39a12</i>	-1,41	-2,66	0,00230
<i>Tle3</i>	-1,41	-2,66	0,00090
<i>Stambpl1</i>	-1,41	-2,66	0,00060
<i>Dapp1</i>	-1,42	-2,67	0,00070
<i>Zfp60</i>	-1,42	-2,67	0,00005
<i>Ppp4r1</i>	-1,42	-2,67	0,00006
<i>A730008H23Rik; Hjurp; 6430706D22Rik</i>	-1,43	-2,7	0,00002
<i>St3gal5</i>	-1,43	-2,7	0,00020
<i>Tmcc3</i>	-1,43	-2,7	0,00040
<i>Tpst2</i>	-1,44	-2,71	0,00001
<i>Adam3</i>	-1,44	-2,72	0,00090
<i>Rasgrp4</i>	-1,45	-2,73	0,00003
<i>Per1</i>	-1,45	-2,73	0,00002
<i>Azin1</i>	-1,45	-2,73	0,00040
<i>Gm10409</i>	-1,45	-2,74	0,00030
<i>Ddit3</i>	-1,45	-2,74	0,00020
<i>Pde3b</i>	-1,46	-2,76	0,00000
<i>Slco2b1</i>	-1,48	-2,79	0,00007
<i>Gm10406</i>	-1,48	-2,79	0,00040
<i>Mtss1</i>	-1,48	-2,79	0,00008
<i>Tmem204</i>	-1,48	-2,79	0,00020
<i>Srgap2</i>	-1,49	-2,81	0,00002
<i>Ggta1</i>	-1,50	-2,82	0,00050
<i>Ccr5</i>	-1,50	-2,82	0,00003
<i>Gm3500</i>	-1,50	-2,82	0,00050
<i>Pmepa1</i>	-1,52	-2,86	0,00001
<i>Klf6</i>	-1,53	-2,88	0,00006
<i>Camk2d</i>	-1,54	-2,9	0,00001
<i>Gm3020; Gm10409</i>	-1,54	-2,91	0,00100
<i>2610042L04Rik</i>	-1,54	-2,91	0,00040
<i>Fam72a</i>	-1,55	-2,92	0,00000



ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Gm3298</i>	-1,56	-2,94	0,00030
<i>Gm2237</i>	-1,56	-2,95	0,00020
<i>Tmem56</i>	-1,57	-2,97	0,00020
<i>Nfia</i>	-1,57	-2,97	0,00009
<i>Plxna4</i>	-1,57	-2,97	0,00040
<i>Flcn</i>	-1,58	-2,98	0,00030
<i>Vsir</i>	-1,58	-2,99	0,00000
<i>Cep68</i>	-1,58	-2,99	0,00010
<i>Fam102b</i>	-1,58	-3	0,00006
<i>Myo1b</i>	-1,59	-3,01	0,00006
<i>Rps26</i>	-1,59	-3,01	0,00030
<i>Gm5458</i>	-1,60	-3,03	0,00070
<i>Man1a</i>	-1,61	-3,05	0,00280
<i>Atat1</i>	-1,61	-3,05	0,00007
<i>P2ry12</i>	-1,61	-3,06	0,00001
<i>Gm3047</i>	-1,62	-3,07	0,00070
<i>Aste1</i>	-1,62	-3,08	0,00030
<i>St3gal6</i>	-1,65	-3,14	0,00005
<i>Gm8159</i>	-1,66	-3,17	0,00050
<i>Gm3591</i>	-1,67	-3,18	0,00030
<i>Adgrg1</i>	-1,67	-3,19	0,00001
<i>Gm3460</i>	-1,67	-3,19	0,00050
<i>Rhobtb1</i>	-1,68	-3,21	0,00005
<i>Gm3002</i>	-1,68	-3,21	0,00008
<i>Gm10021</i>	-1,68	-3,21	0,00004
<i>Whrn</i>	-1,70	-3,24	0,00002
<i>I830077J02Rik</i>	-1,70	-3,25	0,00200
<i>Zfp59</i>	-1,70	-3,25	0,00006
<i>Agmo</i>	-1,70	-3,25	0,00000
<i>Chd9</i>	-1,71	-3,27	0,00060
<i>Stx19</i>	-1,71	-3,27	0,00080
<i>Ccdc9</i>	-1,71	-3,28	0,00040
<i>Gm8374</i>	-1,71	-3,28	0,00080
<i>Gm8297</i>	-1,72	-3,29	0,00050
<i>Gm3752; Gm2897</i>	-1,72	-3,29	0,00040
<i>Gm3383; Gm3194</i>	-1,72	-3,3	0,00020
<i>Gm3500</i>	-1,73	-3,31	0,00040
<i>Eef2k</i>	-1,74	-3,34	0,00003
<i>Gm10382; Gm19631</i>	-1,75	-3,36	0,00005
<i>Gm3667</i>	-1,75	-3,36	0,00060
<i>Fcrl1</i>	-1,75	-3,37	0,00003





## ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Lpar6</i>	-1,76	-3,38	0,00000
<i>Fos</i>	-1,77	-3,41	0,00002
<i>Gm3239</i>	-1,77	-3,41	0,00020
<i>Gm10340</i>	-1,77	-3,41	0,00040
<i>Gm2956</i>	-1,77	-3,41	0,00040
<i>P2ry13</i>	-1,77	-3,42	0,00000
<i>Rapgef5</i>	-1,78	-3,44	0,00000
<i>Klf4</i>	-1,79	-3,46	0,00090
<i>Klf2</i>	-1,79	-3,46	0,00009
<i>Gm3317</i>	-1,81	-3,5	0,00005
<i>Gm3488; Gm3317</i>	-1,81	-3,5	0,00005
<i>Elmo1</i>	-1,82	-3,53	0,00004
<i>Slco4a1</i>	-1,83	-3,55	0,00005
<i>Rassf2</i>	-1,83	-3,56	0,00020
<i>Rb1</i>	-1,84	-3,58	0,00000
<i>Eng</i>	-1,85	-3,6	0,00260
<i>Gm3264</i>	-1,87	-3,65	0,00020
<i>Fosb</i>	-1,88	-3,69	0,00004
<i>Rps6ka1</i>	-1,89	-3,7	0,00002
<i>Dnajb4</i>	-1,89	-3,71	0,00001
<i>Gm3005; Gm2897</i>	-1,91	-3,75	0,00030
<i>Prkca</i>	-1,91	-3,76	0,00008
<i>Jun</i>	-1,92	-3,78	0,00000
<i>Gm2974</i>	-1,94	-3,85	0,00010
<i>Rad9b</i>	-1,95	-3,86	0,00060
<i>Sall1</i>	-1,95	-3,87	0,00000
<i>Gm21693</i>	-1,97	-3,92	0,00170
<i>Prkce</i>	-1,98	-3,95	0,00020
<i>Gm3629; Gm2897</i>	-1,99	-3,98	0,00100
<i>Gm3739</i>	-1,99	-3,98	0,00100
<i>Tlr5</i>	-2,00	-3,99	0,00050
<i>Pld1</i>	-2,00	-3,99	0,00001
<i>Nos1ap</i>	-2,00	-4,01	0,00008
<i>Ivns1abp</i>	-2,03	-4,08	0,00000
<i>Txnip</i>	-2,03	-4,09	0,00000
<i>Fam71a</i>	-2,04	-4,11	0,00090
<i>Ptpro</i>	-2,04	-4,11	0,00020
<i>Gm3252; Gm2897</i>	-2,04	-4,11	0,00110
<i>Hspa1a</i>	-2,04	-4,12	0,00190
<i>LOC100861615; Gm3411</i>	-2,09	-4,25	0,00040
<i>Gm5796</i>	-2,10	-4,3	0,00040



ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Cd164</i>	-2,15	-4,43	0,00000
<i>Ptgs1</i>	-2,17	-4,51	0,00000
<i>Epha2</i>	-2,27	-4,82	0,00002
<i>Hrh2</i>	-2,31	-4,97	0,00030
<i>Csmd3</i>	-2,36	-5,13	0,00004
<i>Dnajb1</i>	-2,37	-5,17	0,00020
<i>Nrip1</i>	-2,41	-5,33	0,00000
<i>Adrb2</i>	-2,50	-5,66	0,00000
<i>Il7r</i>	-2,51	-5,71	0,00000
<i>Tsc22d3</i>	-2,53	-5,76	0,00000
<i>Itga9</i>	-2,55	-5,85	0,00000
<i>Arrdc3</i>	-2,58	-5,96	0,00000
<i>Khdrbs3</i>	-2,63	-6,2	0,00003
<i>Gpr165</i>	-2,82	-7,08	0,00000
<i>Crybb1</i>	-3,05	-8,26	0,00000
<i>Gm20481</i>	-3,06	-8,35	0,00180
<i>Tmem119</i>	-3,07	-8,38	0,00000
<i>Upk1b</i>	-3,08	-8,45	0,00000
<i>Slc2a5</i>	-3,30	-9,82	0,00000
<i>Bank1</i>	-3,99	-15,84	0,00000



## ANEXOS

### Tabla suplementaria 7

Tabla suplementaria 7. Genes diferencialmente expresados en la microglía de ratones *APP<sup>751SL</sup>* versus a la de ratones *MAPT<sup>p.P301S</sup>*. Genes que incrementan y disminuyen su expresión en la microglía de ratones *APP<sup>751SL</sup>* de 12 meses de edad versus a la microglía de ratones *MAPT<sup>p.P301S</sup>* de 9 meses de edad. ( $|\log FC| > 0,5$  y  $p < 0,05$ ).

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Igf1</i>	4,17	18,06	0,00000
<i>Egln3</i>	3,66	12,61	0,00000
<i>Gpnmb</i>	3,58	11,98	0,00010
<i>Mamdc2</i>	3,30	9,84	0,00000
<i>Etl4</i>	3,21	9,26	0,00000
<i>Adarb1</i>	2,89	7,42	0,00000
<i>Gm1673</i>	2,77	6,83	0,00030
<i>Lgi2</i>	2,65	6,29	0,00000
<i>Fabp3</i>	2,63	6,17	0,00000
<i>Gcnt2</i>	2,62	6,13	0,00001
<i>Ldlr</i>	2,58	6	0,00000
<i>Plp2</i>	2,53	5,77	0,00000
<i>Cd200r4</i>	2,45	5,47	0,00005
<i>Fabp5</i>	2,40	5,28	0,00000
<i>Wfdc17</i>	2,36	5,13	0,00005
<i>Dkk2</i>	2,18	4,53	0,00002
<i>Myo1e</i>	2,18	4,53	0,00001
<i>Dcstamp</i>	2,14	4,42	0,00000
<i>Gas6</i>	2,12	4,35	0,00001
<i>Sc5d</i>	2,08	4,22	0,00000
<i>Nexn</i>	2,03	4,09	0,00020
<i>Mrc2</i>	2,01	4,02	0,00002
<i>Ero1l</i>	2,00	4,01	0,00001
<i>Trpm1</i>	1,97	3,93	0,00002
<i>Dab2</i>	1,97	3,91	0,00001
<i>Masp1</i>	1,92	3,78	0,00001
<i>Gfap</i>	1,89	3,7	0,00020
<i>Psat1</i>	1,89	3,7	0,00000
<i>Ctse</i>	1,88	3,68	0,00000
<i>Tmem154</i>	1,88	3,67	0,00020
<i>Ifitm2</i>	1,87	3,66	0,00000
<i>Hpse</i>	1,86	3,64	0,00003
<i>Actr3b</i>	1,83	3,56	0,00001
<i>Ank; Mir7117</i>	1,82	3,53	0,00003
<i>Serpine2</i>	1,79	3,46	0,00000
<i>F3</i>	1,76	3,39	0,00007



ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Tmem163</i>	1,72	3,3	0,00003
<i>Slc2a1</i>	1,72	3,29	0,00005
<i>Msmo1</i>	1,71	3,28	0,00002
<i>Ramp1</i>	1,67	3,18	0,00003
<i>Clec1a</i>	1,66	3,17	0,00001
<i>Anxa2</i>	1,58	3	0,00008
<i>Tpi1</i>	1,57	2,97	0,00000
<i>Ndufa1</i>	1,53	2,89	0,00010
<i>Prdx4</i>	1,53	2,89	0,00020
<i>Cst7</i>	1,52	2,87	0,00001
<i>Gm1966</i>	1,52	2,86	0,00008
<i>Aplp2</i>	1,51	2,84	0,00000
<i>Tmem205</i>	1,50	2,82	0,00003
<i>Serpine1</i>	1,47	2,77	0,00004
<i>Zfand2a</i>	1,47	2,77	0,00010
<i>Asb10</i>	1,46	2,76	0,00020
<i>Hif1a</i>	1,44	2,72	0,00004
<i>Syngr1</i>	1,44	2,71	0,00003
<i>Trem1</i>	1,41	2,66	0,00006
<i>Gusb</i>	1,38	2,61	0,00003
<i>Pdk1</i>	1,36	2,56	0,00020
<i>Slc16a3</i>	1,36	2,56	0,00009
<i>St14</i>	1,34	2,54	0,00001
<i>Pick1</i>	1,34	2,53	0,00008
<i>Pmp22</i>	1,33	2,52	0,00001
<i>Hmgcr</i>	1,33	2,52	0,00002
<i>Fdps</i>	1,31	2,48	0,00003
<i>Plpp1</i>	1,31	2,48	0,00003
<i>Sreb2</i>	1,31	2,48	0,00000
<i>Plxna2</i>	1,29	2,45	0,00007
<i>Gm20721</i>	1,27	2,41	0,00009
<i>Mir23b; Mir27b; Mir24-1; 2010111101Rik</i>	1,27	2,41	0,00003
<i>Cep78</i>	1,26	2,4	0,00006
<i>Lsp1</i>	1,24	2,36	0,00001
<i>Adssl1</i>	1,20	2,3	0,00010
<i>Arap2</i>	1,19	2,28	0,00006
<i>Cyp51</i>	1,15	2,22	0,00020
<i>Tsc22d3</i>	1,13	2,19	0,00020
<i>Cpeb1</i>	1,12	2,18	0,00006
<i>Arsb</i>	1,10	2,15	0,00003
<i>Insig1</i>	1,10	2,14	0,00020



## ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Slc24a1</i>	1,06	2,09	0,00010
<i>Tln2</i>	1,00	2	0,00010
<i>Ldha</i>	0,97	1,96	0,00010
<i>St6gal1</i>	0,87	1,83	0,00020
<i>Sdf4</i>	0,85	1,8	0,00020
<i>Tmsb10</i>	-0,97	-1,96	0,00020
<i>Slamf9</i>	-1,05	-2,07	0,00020
<i>Ccl6</i>	-1,06	-2,08	0,00010
<i>Tmem173</i>	-1,12	-2,18	0,00002
<i>Zswim6</i>	-1,14	-2,2	0,00010
<i>Il2rg</i>	-1,21	-2,32	0,00030
<i>Gm11710; Gm11711; Cd300lh</i>	-1,22	-2,33	0,00020
<i>BC035044</i>	-1,24	-2,36	0,00020
<i>Abca1</i>	-1,41	-2,66	0,00004
<i>Fxyd6</i>	-1,44	-2,71	0,00000
<i>Tgm2</i>	-1,45	-2,73	0,00003
<i>H2-DMa</i>	-1,49	-2,81	0,00004
<i>Klrb1b</i>	-1,51	-2,84	0,00007
<i>Scimp</i>	-1,51	-2,84	0,00004
<i>Lst1</i>	-1,51	-2,84	0,00006
<i>Clec4a3</i>	-1,51	-2,85	0,00020
<i>Fgr</i>	-1,54	-2,91	0,00002
<i>Ms4a6d</i>	-1,68	-3,21	0,00005
<i>Lag3</i>	-1,80	-3,49	0,00000
<i>Gatm</i>	-1,86	-3,64	0,00000
<i>C3</i>	-2,02	-4,06	0,00001
<i>Il12b</i>	-2,04	-4,1	0,00000
<i>Ccl9</i>	-2,05	-4,13	0,00000
<i>Klrb1c</i>	-2,06	-4,16	0,00004
<i>Tnf</i>	-2,07	-4,21	0,00005
<i>Mmp2</i>	-2,16	-4,47	0,00001
<i>Stab1</i>	-2,23	-4,7	0,00001
<i>Klrb1a</i>	-2,32	-4,98	0,00000
<i>Siglec</i>	-2,40	-5,26	0,00000
<i>Klk8</i>	-2,42	-5,35	0,00000
<i>H2-Aa</i>	-2,59	-6,03	0,00000
<i>Postn</i>	-2,98	-7,89	0,00000
<i>Cd74; Mir5107</i>	-3,02	-8,12	0,00000
<i>Cfb</i>	-3,18	-9,07	0,00002
<i>H2-Ab1</i>	-3,19	-9,1	0,00000
<i>Olr1</i>	-4,28	-19,48	0,00002



ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	<i>p</i>
<i>H2-Eb1</i>	-4,40	-21,09	0,00000

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

000008745e2000018471

CSV

GEISER-b98a-07b6-3623-49c3-ad52-a64c-f2a1-5d07

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 12:08:10 Horario peninsular



## ANEXOS

## Tabla suplementaria 8

Tabla suplementaria 8. Genes diferencialmente expresados en la microglía aislada de ratones *Elgn3*<sup>-/-</sup>; *APP-PSEN1* versus *APP-PSEN1*. Genes que incrementan y disminuyen su expresión en microglía CD11b+/CD45+ aislada mediante FACS de ratones de 12 meses de edad *Elgn3*<sup>-/-</sup>; *APP-PSEN1* versus *APP-PSEN1* ( $|\log FC| > 0,5$  y  $p < 0,05$ ).

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Mamdc2</i>	2,13	4,39	0,00009
<i>Prkd1</i>	2,02	4,05	0,00000
<i>H2-Eb1</i>	1,99	3,96	0,00009
<i>Postn</i>	1,98	3,95	0,00003
<i>Dkk2</i>	1,81	3,51	0,00018
<i>Gdpd3</i>	1,76	3,38	0,00007
<i>Cxcl14</i>	1,54	2,92	0,00009
<i>Ly6k</i>	1,45	2,74	0,00010
<i>Lgi2</i>	1,42	2,68	0,01549
<i>Ctnna3</i>	1,41	2,65	0,00216
<i>Gpnmb</i>	1,36	2,57	0,02569
<i>H2-Ab1</i>	1,36	2,57	0,00019
<i>Spp1</i>	1,35	2,56	0,00611
<i>Flt1</i>	1,29	2,44	0,00007
<i>Lpl</i>	1,26	2,39	0,00006
<i>Klrb1a</i>	1,22	2,33	0,01011
<i>Pianp</i>	1,22	2,33	0,00001
<i>Abi3bp</i>	1,22	2,32	0,04246
<i>H2-Aa</i>	1,22	2,32	0,00051
<i>Gm13669</i>	1,18	2,27	0,00604
<i>Trpc4</i>	1,16	2,24	0,00012
<i>Cd74</i>	1,11	2,16	0,00021
<i>Colec12</i>	1,10	2,15	0,00431
<i>Slc41a2</i>	1,10	2,15	0,00027
<i>Tgfb2</i>	1,09	2,13	0,00310
<i>Fn1</i>	1,07	2,10	0,00390
<i>Cspg4</i>	1,07	2,09	0,00116
<i>Actr3b</i>	1,07	2,09	0,00126
<i>Cxcl13</i>	1,05	2,07	0,01451
<i>Plp2</i>	1,03	2,05	0,00294
<i>Gm6166</i>	1,03	2,04	0,00029
<i>Fam189a2</i>	1,02	2,03	0,00074
<i>Fam19a2</i>	1,02	2,03	0,01948
<i>Ahr</i>	1,02	2,03	0,00007
<i>Gm14328</i>	1,00	2,01	0,00011
<i>Sh3pxd2b</i>	0,99	1,99	0,00250
<i>Fabp5</i>	0,97	1,96	0,00019



ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Fabp5l2</i>	0,97	1,96	0,00030
<i>Gm6100</i>	0,95	1,93	0,00001
<i>Alcam</i>	0,94	1,92	0,00064
<i>Gm3601</i>	0,94	1,92	0,00077
<i>Tmem163</i>	0,93	1,90	0,00006
<i>Atp6v0d2</i>	0,92	1,89	0,01671
<i>Gm5423</i>	0,91	1,87	0,00238
<i>Yipf7</i>	0,90	1,86	0,00228
<i>Perp</i>	0,89	1,86	0,00024
<i>Elov17</i>	0,88	1,84	0,00137
<i>Gm13998</i>	0,88	1,84	0,00030
<i>Sulf2</i>	0,88	1,84	0,00074
<i>Fbln5</i>	0,87	1,83	0,00008
<i>Adssl1</i>	0,86	1,82	0,00166
<i>Mxra8</i>	0,86	1,82	0,00692
<i>Msr1</i>	0,85	1,81	0,01291
<i>Agap1</i>	0,84	1,79	0,00072
<i>Hal</i>	0,83	1,78	0,00012
<i>Fxyd6</i>	0,82	1,77	0,00487
<i>Olr1</i>	0,81	1,75	0,00372
<i>St8sia6</i>	0,80	1,74	0,00152
<i>Plxna2</i>	0,80	1,74	0,03748
<i>Igfbp5</i>	0,80	1,74	0,01142
<i>Mrc2</i>	0,80	1,74	0,00244
<i>Cxcr4</i>	0,79	1,73	0,01018
<i>Lgals1</i>	0,79	1,73	0,01309
<i>Ptprg</i>	0,78	1,72	0,01286
<i>Gm25911</i>	0,78	1,72	0,00011
<i>Cacnb4</i>	0,77	1,71	0,00847
<i>Gm14584</i>	0,77	1,70	0,00244
<i>Wdr35</i>	0,76	1,70	0,00021
<i>Plxnc1</i>	0,75	1,68	0,00142
<i>Galc</i>	0,74	1,67	0,00012
<i>Gm25732</i>	0,73	1,66	0,00037
<i>Clec7a</i>	0,72	1,65	0,00543
<i>Tmem176a</i>	0,72	1,65	0,00009
<i>Vegfa</i>	0,71	1,64	0,00177
<i>Fyn</i>	0,71	1,64	0,00400
<i>Efr3b</i>	0,71	1,63	0,00222
<i>Kif1a</i>	0,71	1,63	0,00392
<i>Atp1a3</i>	0,70	1,63	0,00094





## ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Fndc4</i>	0,70	1,63	0,00104
<i>Igsf10</i>	0,70	1,63	0,02138
<i>Rnf128</i>	0,70	1,63	0,00157
<i>Gm19386</i>	0,70	1,62	0,00257
<i>Gpr81</i>	0,69	1,62	0,00223
<i>Gm11166</i>	0,68	1,60	0,02907
<i>Gas7</i>	0,68	1,60	0,00274
<i>Itgax</i>	0,67	1,59	0,00163
<i>AI504432</i>	0,66	1,58	0,00949
<i>Ephx1</i>	0,66	1,58	0,00398
<i>Ank</i>	0,65	1,57	0,00074
<i>Asb10</i>	0,65	1,57	0,00009
<i>Tmem176b</i>	0,64	1,56	0,00032
<i>Laptm4a</i>	0,64	1,56	0,00010
<i>Zfp618</i>	0,63	1,55	0,00200
<i>Galns</i>	0,63	1,55	0,00043
<i>Arap2</i>	0,63	1,55	0,00195
<i>Fgf13</i>	0,63	1,55	0,00043
<i>Etl4</i>	0,63	1,55	0,00213
<i>Crip1</i>	0,63	1,55	0,00149
<i>Ccr2</i>	0,63	1,55	0,03799
<i>Chst11</i>	0,63	1,54	0,00050
<i>Wif1</i>	0,63	1,54	0,00965
<i>Maoa</i>	0,62	1,54	0,00110
<i>n-R5s54</i>	0,62	1,53	0,02924
<i>Fam214a</i>	0,62	1,53	0,00022
<i>Vim</i>	0,61	1,53	0,01223
<i>Rasd1</i>	0,61	1,53	0,00074
<i>Procr</i>	0,61	1,52	0,00171
<i>Myo5a</i>	0,61	1,52	0,00609
<i>Emp2</i>	0,60	1,52	0,00383
<i>Ighv1-69</i>	0,60	1,52	0,00863
<i>Gm24245</i>	0,60	1,51	0,00070
<i>Gm24270</i>	0,60	1,51	0,00070
<i>Gm24187</i>	0,60	1,51	0,00054
<i>Gm26993</i>	0,60	1,51	0,00994
<i>Gm26214</i>	0,60	1,51	0,02184
<i>Apoc1</i>	0,59	1,51	0,02315
<i>Bambi</i>	0,59	1,51	0,00789
<i>Cers4</i>	0,59	1,51	0,00076
<i>Usp30</i>	0,59	1,50	0,00123



ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Wfdc17</i>	0,59	1,50	0,02544
<i>Gm8034</i>	0,58	1,50	0,00685
<i>Leprel4</i>	0,58	1,50	0,00105
<i>Naaa</i>	0,58	1,50	0,00227
<i>Pdcd1</i>	0,58	1,49	0,00729
<i>Gm3788</i>	0,58	1,49	0,00162
<i>Slc44a1</i>	0,57	1,49	0,00166
<i>Gm23388</i>	0,57	1,49	0,00047
<i>Arnt2</i>	0,57	1,49	0,01024
<i>Nr4a2</i>	0,57	1,48	0,00282
<i>Iqcg</i>	0,57	1,48	0,00196
<i>Gm15418</i>	0,57	1,48	0,02237
<i>Lama3</i>	0,57	1,48	0,00510
<i>Ppap2a</i>	0,56	1,48	0,00329
<i>Arrdc4</i>	0,56	1,48	0,00304
<i>Rai14</i>	0,56	1,48	0,00237
<i>Gpx3</i>	0,55	1,46	0,04271
<i>Selm</i>	0,55	1,46	0,00429
<i>Tmem203</i>	0,55	1,46	0,00168
<i>Acp5</i>	0,55	1,46	0,00438
<i>Mcam</i>	0,54	1,46	0,00569
<i>Gm25554</i>	0,54	1,46	0,00362
<i>Lyzl4</i>	0,54	1,45	0,03060
<i>Ipcef1</i>	0,53	1,45	0,00864
<i>Fmr1nb</i>	0,53	1,45	0,01723
<i>F2r</i>	0,53	1,44	0,00078
<i>Dapk1</i>	0,53	1,44	0,00543
<i>Tbc1d4</i>	0,53	1,44	0,00163
<i>Kcnk3</i>	0,52	1,44	0,00053
<i>Prr15</i>	0,52	1,44	0,02006
<i>Arg2</i>	0,52	1,44	0,00642
<i>Olfr152</i>	0,52	1,44	0,01459
<i>St14</i>	0,52	1,44	0,00509
<i>Hdac9</i>	0,52	1,44	0,00210
<i>Sycp3</i>	0,52	1,44	0,03402
<i>Gramd3</i>	0,52	1,43	0,00078
<i>Crtap</i>	0,52	1,43	0,00856
<i>S100a1</i>	0,52	1,43	0,00930
<i>Gyg</i>	0,52	1,43	0,00613
<i>Rgs1</i>	0,52	1,43	0,01377
<i>Ptn</i>	0,52	1,43	0,02694



## ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Mptx1</i>	0,51	1,43	0,03055
<i>Pvr11</i>	0,51	1,42	0,02228
<i>Maged1</i>	0,51	1,42	0,00090
<i>Mt2</i>	0,51	1,42	0,00216
<i>Naglu</i>	0,51	1,42	0,02009
<i>Cd34</i>	0,50	1,42	0,00971
<i>Fabp3-ps1</i>	0,50	1,42	0,01169
<i>mmu-mir-6398</i>	0,50	1,42	0,04493
<i>Tmem181a</i>	-0,50	0,71	0,01863
<i>Vsnl1</i>	-0,50	0,71	0,01248
<i>Egr3</i>	-0,50	0,71	0,02021
<i>Gm11883</i>	-0,50	0,71	0,00105
<i>Gm10337</i>	-0,51	0,70	0,00925
<i>Gm11912</i>	-0,51	0,70	0,02735
<i>Optn</i>	-0,51	0,70	0,03637
<i>C5ar1</i>	-0,51	0,70	0,01158
<i>Prkab2</i>	-0,51	0,70	0,03554
<i>Rab1</i>	-0,51	0,70	0,04144
<i>Gbp10</i>	-0,52	0,70	0,01346
<i>Stard9</i>	-0,52	0,70	0,00078
<i>Tmem181b-ps</i>	-0,52	0,70	0,02214
<i>Dst</i>	-0,52	0,70	0,00756
<i>Trim25</i>	-0,52	0,70	0,00927
<i>Gm7278</i>	-0,52	0,70	0,00211
<i>Gm11261</i>	-0,52	0,70	0,00222
<i>Gm25271</i>	-0,52	0,70	0,02986
<i>Mir342</i>	-0,52	0,70	0,04072
<i>Mir342</i>	-0,52	0,70	0,04072
<i>Mir221</i>	-0,52	0,70	0,01455
<i>G2e3</i>	-0,52	0,70	0,00987
<i>Lilra5</i>	-0,52	0,70	0,02375
<i>Man1a</i>	-0,52	0,70	0,02555
<i>Grap</i>	-0,52	0,70	0,00432
<i>Gm22060</i>	-0,53	0,69	0,02348
<i>Rbbp8</i>	-0,53	0,69	0,02864
<i>Gm21886</i>	-0,53	0,69	0,00089
<i>Dock4</i>	-0,53	0,69	0,00354
<i>Gm14737</i>	-0,53	0,69	0,00421
<i>Mir3074-1</i>	-0,53	0,69	0,00733
<i>Peg10</i>	-0,54	0,69	0,00122
<i>Bzw1</i>	-0,54	0,69	0,04535



ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Gm25109</i>	-0,54	0,69	0,02185
<i>Gm12812</i>	-0,54	0,69	0,00682
<i>Mir325</i>	-0,54	0,69	0,02566
<i>Phxr4</i>	-0,54	0,69	0,02530
<i>Il12rb2</i>	-0,54	0,69	0,00860
<i>Ifnb1</i>	-0,54	0,69	0,02909
<i>Fth-ps2</i>	-0,54	0,69	0,02475
<i>Mir103-2</i>	-0,54	0,69	0,01741
<i>Gm14265</i>	-0,55	0,69	0,00105
<i>Gm11886</i>	-0,55	0,68	0,00037
<i>Ptpn23</i>	-0,55	0,68	0,01372
<i>Gm14888</i>	-0,55	0,68	0,00196
<i>Ifitm3</i>	-0,55	0,68	0,02003
<i>Gm13570</i>	-0,56	0,68	0,00473
<i>Gm23121</i>	-0,56	0,68	0,02856
<i>Camkk2</i>	-0,56	0,68	0,02477
<i>Gm12840</i>	-0,56	0,68	0,00735
<i>Gem</i>	-0,56	0,68	0,04839
<i>Cryba4</i>	-0,56	0,68	0,00759
<i>Gm15186</i>	-0,56	0,68	0,01144
<i>Lilrb3</i>	-0,57	0,68	0,00540
<i>Gm11652</i>	-0,57	0,68	0,00792
<i>Gm26857</i>	-0,57	0,67	0,00084
<i>Btaf1</i>	-0,57	0,67	0,02151
<i>Oasl2</i>	-0,57	0,67	0,01245
<i>Zfhx3</i>	-0,57	0,67	0,01429
<i>mmu-mir-6541</i>	-0,57	0,67	0,01666
<i>Gm11995</i>	-0,58	0,67	0,00220
<i>Gm5844</i>	-0,58	0,67	0,03148
<i>Abl2</i>	-0,58	0,67	0,00048
<i>Gm15368</i>	-0,58	0,67	0,02492
<i>Gm13710</i>	-0,58	0,67	0,00238
<i>Enpp4</i>	-0,58	0,67	0,00110
<i>Hbb-bs</i>	-0,58	0,67	0,00245
<i>Tmem181c-ps</i>	-0,58	0,67	0,02008
<i>RP23-142E18.5</i>	-0,58	0,67	0,00388
<i>AW046200</i>	-0,58	0,67	0,02614
<i>Gm26520</i>	-0,58	0,67	0,00083
<i>Cd40</i>	-0,58	0,67	0,00127
<i>Bco2</i>	-0,58	0,67	0,00621
<i>Lonrf1</i>	-0,59	0,67	0,02994



## ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Gm26430</i>	-0,59	0,66	0,01300
<i>Stab1</i>	-0,59	0,66	0,00396
<i>Gm13765</i>	-0,59	0,66	0,00488
<i>Gm24273</i>	-0,59	0,66	0,01784
<i>Gm4583</i>	-0,60	0,66	0,02542
<i>BC035044</i>	-0,60	0,66	0,00494
<i>Gm10099</i>	-0,60	0,66	0,00162
<i>Trim30a</i>	-0,60	0,66	0,00517
<i>Hivep1</i>	-0,60	0,66	0,00531
<i>Clec4a3</i>	-0,60	0,66	0,02731
<i>Gm23247</i>	-0,61	0,66	0,00741
<i>Pira2</i>	-0,61	0,66	0,00601
<i>Gm10091</i>	-0,61	0,66	0,00730
<i>Trim12c</i>	-0,61	0,65	0,01290
<i>Gm14749</i>	-0,61	0,65	0,00076
<i>Gm19279</i>	-0,61	0,65	0,00960
<i>Gm23734</i>	-0,61	0,65	0,00525
<i>Ddx58</i>	-0,61	0,65	0,01245
<i>Rufy3</i>	-0,62	0,65	0,01806
<i>Gm12346</i>	-0,62	0,65	0,02916
<i>Gm25993</i>	-0,62	0,65	0,04386
<i>Gm23553</i>	-0,62	0,65	0,02554
<i>fasapoptosis</i>	-0,63	0,65	0,01117
<i>Pttg1</i>	-0,63	0,65	0,00481
<i>Gm23730</i>	-0,63	0,65	0,04994
<i>Crybb1</i>	-0,63	0,65	0,00121
<i>Gm19703</i>	-0,63	0,65	0,03090
<i>Gm22888</i>	-0,63	0,65	0,02123
<i>Xdh</i>	-0,63	0,65	0,00189
<i>Elmo1</i>	-0,63	0,65	0,00264
<i>Gm13519</i>	-0,64	0,64	0,00014
<i>Swap70</i>	-0,64	0,64	0,00670
<i>Atp6v1d</i>	-0,64	0,64	0,00667
<i>Gm12437</i>	-0,64	0,64	0,00637
<i>Gm24198</i>	-0,64	0,64	0,00793
<i>Olfr755-ps1</i>	-0,64	0,64	0,00342
<i>Tank</i>	-0,64	0,64	0,01364
<i>Gm20689</i>	-0,64	0,64	0,00353
<i>Ap4s1</i>	-0,64	0,64	0,00272
<i>Ccl5</i>	-0,64	0,64	0,00138
<i>Parp14</i>	-0,65	0,64	0,00500



ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Gm25966</i>	-0,65	0,64	0,04124
<i>Mir5124</i>	-0,65	0,64	0,00191
<i>Gm4992</i>	-0,65	0,64	0,00091
<i>Gm24959</i>	-0,65	0,64	0,04018
<i>Pira1</i>	-0,65	0,64	0,00416
<i>Lst1</i>	-0,66	0,63	0,00020
<i>Gm17024</i>	-0,66	0,63	0,01789
<i>Gm22731</i>	-0,66	0,63	0,00089
<i>Gm14063</i>	-0,66	0,63	0,00081
<i>Tnfsf9</i>	-0,66	0,63	0,00486
<i>Dock10</i>	-0,66	0,63	0,01132
<i>mmu-mir-7679</i>	-0,67	0,63	0,00269
<i>Gm11545</i>	-0,67	0,63	0,03635
<i>Ifit2</i>	-0,67	0,63	0,01858
<i>Gm15971</i>	-0,67	0,63	0,01723
<i>Epha2</i>	-0,67	0,63	0,00059
<i>Gm14814</i>	-0,68	0,63	0,00066
<i>Dapp1</i>	-0,68	0,62	0,02917
<i>Gm10933</i>	-0,68	0,62	0,02700
<i>Ccl9</i>	-0,69	0,62	0,00623
<i>Gm11753</i>	-0,70	0,62	0,02018
<i>Trim30b</i>	-0,70	0,62	0,00500
<i>Gbp7</i>	-0,70	0,62	0,00481
<i>Usp18</i>	-0,70	0,62	0,00747
<i>Lgals3bp</i>	-0,70	0,61	0,01330
<i>Mir505</i>	-0,70	0,61	0,00683
<i>Gm14941</i>	-0,70	0,61	0,00168
<i>Gm13701</i>	-0,71	0,61	0,00295
<i>Gm14702</i>	-0,71	0,61	0,00272
<i>Gm13468</i>	-0,71	0,61	0,00150
<i>Gm20100</i>	-0,71	0,61	0,01098
<i>Gm14928</i>	-0,72	0,61	0,00041
<i>Slc2a5</i>	-0,72	0,61	0,04417
<i>Gm14672</i>	-0,72	0,61	0,00682
<i>Gm14654</i>	-0,72	0,61	0,00273
<i>Sp100</i>	-0,73	0,60	0,00112
<i>Odc1</i>	-0,73	0,60	0,00066
<i>LOC432823</i>	-0,73	0,60	0,00098
<i>Gm3513</i>	-0,74	0,60	0,00047
<i>Gm23136</i>	-0,74	0,60	0,01239
<i>Gm16558</i>	-0,74	0,60	0,00619



## ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Gm13357</i>	-0,75	0,60	0,02617
<i>Gm14969</i>	-0,75	0,60	0,00006
<i>Baiap2</i>	-0,75	0,60	0,00328
<i>Gm14700</i>	-0,75	0,59	0,00554
<i>Slfn8</i>	-0,75	0,59	0,00337
<i>n-R5s47</i>	-0,76	0,59	0,03126
<i>Hba-a1</i>	-0,76	0,59	0,00696
<i>Gm14708</i>	-0,76	0,59	0,00041
<i>Gm15470</i>	-0,77	0,59	0,00056
<i>Gm4955</i>	-0,77	0,59	0,00357
<i>Bank1</i>	-0,78	0,58	0,00235
<i>Rtp4</i>	-0,78	0,58	0,01008
<i>Gm13574</i>	-0,78	0,58	0,00300
<i>Mnda</i>	-0,79	0,58	0,01373
<i>Sorl1</i>	-0,80	0,57	0,00434
<i>Gm14778</i>	-0,80	0,57	0,00150
<i>mmu-mir-6963</i>	-0,80	0,57	0,02001
<i>Gm12197</i>	-0,80	0,57	0,00454
<i>Gm24783</i>	-0,80	0,57	0,02781
<i>Gm23300</i>	-0,81	0,57	0,00019
<i>Gm9115</i>	-0,81	0,57	0,00033
<i>Gm13840</i>	-0,81	0,57	0,00294
<i>LOC215866</i>	-0,82	0,57	0,00570
<i>Trim5</i>	-0,82	0,57	0,00059
<i>Gm11187</i>	-0,83	0,56	0,00978
<i>Gm15371</i>	-0,84	0,56	0,00617
<i>Gm15146</i>	-0,84	0,56	0,01155
<i>Gm17709</i>	-0,85	0,56	0,00047
<i>Gm14734</i>	-0,85	0,56	0,01189
<i>Mir15a</i>	-0,85	0,55	0,00627
<i>Hbb-bt</i>	-0,85	0,55	0,01025
<i>Gm15724</i>	-0,87	0,55	0,00719
<i>Gm19313</i>	-0,87	0,55	0,00434
<i>mmu-mir-6972</i>	-0,88	0,54	0,00057
<i>Il1f9</i>	-0,89	0,54	0,04514
<i>Gm13018</i>	-0,89	0,54	0,01099
<i>Mir3075</i>	-0,90	0,54	0,01756
<i>Rbpms</i>	-0,90	0,54	0,01504
<i>Gm12651</i>	-0,90	0,53	0,00344
<i>Ggta1</i>	-0,91	0,53	0,00016
<i>Hba-a1</i>	-0,92	0,53	0,00501



ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Mrgpra2a</i>	-0,92	0,53	0,00867
<i>Ccl12</i>	-0,92	0,53	0,01106
<i>Mir5123</i>	-0,92	0,53	0,01465
<i>Nlrp1b</i>	-0,92	0,53	0,00150
<i>Gm14693</i>	-0,93	0,53	0,00987
<i>Mir146</i>	-0,93	0,53	0,01968
<i>Gm24112</i>	-0,94	0,52	0,00961
<i>Gm24927</i>	-0,94	0,52	0,00387
<i>Trim12a</i>	-0,96	0,52	0,00015
<i>Rsad2</i>	-0,96	0,51	0,00140
<i>Ifi27l2a</i>	-0,98	0,51	0,00309
<i>Gm25931</i>	-0,98	0,51	0,00977
<i>Myo1g</i>	-0,99	0,51	0,00223
<i>Gm12424</i>	-0,99	0,50	0,00434
<i>Gm14604</i>	-1,00	0,50	0,00655
<i>Gm25138</i>	-1,00	0,50	0,00008
<i>Gm25549</i>	-1,02	0,49	0,00176
<i>Gm11247</i>	-1,03	0,49	0,00370
<i>Gm24842</i>	-1,04	0,49	0,01264
<i>Al607873</i>	-1,04	0,49	0,00396
<i>Gm11522</i>	-1,04	0,49	0,00053
<i>Oas2</i>	-1,04	0,49	0,00080
<i>Ifi204</i>	-1,08	0,47	0,00323
<i>Gm12785</i>	-1,11	0,46	0,01148
<i>Gm14060</i>	-1,13	0,46	0,00329
<i>Rnf213</i>	-1,13	0,46	0,00128
<i>Pyhin1</i>	-1,14	0,45	0,00104
<i>Oas1g</i>	-1,16	0,45	0,00122
<i>Gm26497</i>	-1,20	0,44	0,02295
<i>Hsph1</i>	-1,24	0,42	0,02032
<i>Oas1a</i>	-1,27	0,41	0,00445
<i>Gm14801</i>	-1,28	0,41	0,01429
<i>Fpr1</i>	-1,33	0,40	0,03973
<i>Gm15445</i>	-1,33	0,40	0,00402
<i>Trim30c</i>	-1,36	0,39	0,00023
<i>Cwc22</i>	-1,37	0,39	0,02667
<i>Mid1</i>	-1,42	0,37	0,00080
<i>Mir34a</i>	-1,50	0,35	0,00314
<i>Gm25720</i>	-1,53	0,35	0,00720
<i>Gm15064</i>	-1,53	0,35	0,02397
<i>Gm13800</i>	-1,56	0,34	0,01458





## ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Zfp125</i>	-1,56	0,34	0,00001
<i>Gm13691</i>	-1,57	0,34	0,03382
<i>Gm21742</i>	-1,65	0,32	0,00022
<i>Nlrp1c-ps</i>	-1,67	0,31	0,00183
<i>Trim30d</i>	-1,72	0,30	0,00832
<i>S100a9</i>	-1,81	0,29	0,02556
<i>Gm13695</i>	-1,81	0,29	0,02972
<i>Gm13698</i>	-1,81	0,29	0,03023
<i>Gm13693</i>	-1,81	0,29	0,03023
<i>Gm13696</i>	-1,81	0,29	0,03023
<i>Gm13694</i>	-1,81	0,29	0,03023
<i>Gm13697</i>	-1,81	0,29	0,03023
<i>Retnlg</i>	-1,93	0,26	0,03561
<i>Gm22748</i>	-2,13	0,23	0,00000
<i>S100a8</i>	-2,29	0,20	0,04194
<i>Egln3</i>	-3,48	0,09	0,00000



## Tabla suplementaria 9

**Tabla suplementaria 9. Genes incluidos en el GS "PHD3KO UP".** Genes que incrementan su expresión en microglía CD11b+/CD45+ aislada mediante FACS de ratones de 12 meses de edad *Elgn3* -/-; *APP-PSEN1* versus *APP-PSEN1* (logFC > 0,5 y  $p < 0,01$ ).

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Mamdc2</i>	2,13	4,39	0,00009
<i>Prkd1</i>	2,02	4,05	0,00000
<i>H2-Eb1</i>	1,99	3,96	0,00009
<i>Postn</i>	1,98	3,95	0,00003
<i>Dkk2</i>	1,81	3,51	0,00018
<i>Gdpd3</i>	1,76	3,38	0,00007
<i>Cxcl14</i>	1,54	2,92	0,00009
<i>Ly6k</i>	1,45	2,74	0,00010
<i>Ctnna3</i>	1,41	2,65	0,00216
<i>H2-Ab1</i>	1,36	2,57	0,00019
<i>Spp1</i>	1,35	2,56	0,00611
<i>Flt1</i>	1,29	2,44	0,00007
<i>Lpl</i>	1,26	2,39	0,00006
<i>Pianp</i>	1,22	2,33	0,00001
<i>H2-Aa</i>	1,22	2,32	0,00051
<i>Gm13669</i>	1,18	2,27	0,00604
<i>Trpc4</i>	1,16	2,24	0,00012
<i>Cd74</i>	1,11	2,16	0,00021
<i>Colec12</i>	1,10	2,15	0,00431
<i>Slc41a2</i>	1,10	2,15	0,00027
<i>Tgfb2</i>	1,09	2,13	0,00310
<i>Fn1</i>	1,07	2,10	0,00390
<i>Cspg4</i>	1,07	2,09	0,00116
<i>Actr3b</i>	1,07	2,09	0,00126
<i>Plp2</i>	1,03	2,05	0,00294
<i>Gm6166</i>	1,03	2,04	0,00029
<i>Fam189a2</i>	1,02	2,03	0,00074
<i>Ahr</i>	1,02	2,03	0,00007
<i>Gm14328</i>	1,00	2,01	0,00011
<i>Sh3pxd2b</i>	0,99	1,99	0,00250
<i>Fabp5</i>	0,97	1,96	0,00019
<i>Fabp5l2</i>	0,97	1,96	0,00030
<i>Gm6100</i>	0,95	1,93	0,00001
<i>Alcam</i>	0,94	1,92	0,00064
<i>Gm3601</i>	0,94	1,92	0,00077
<i>Tmem163</i>	0,93	1,90	0,00006
<i>Gm5423</i>	0,91	1,87	0,00238



## ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Yipf7</i>	0,90	1,86	0,00228
<i>Perp</i>	0,89	1,86	0,00024
<i>Elovl7</i>	0,88	1,84	0,00137
<i>Gm13998</i>	0,88	1,84	0,00030
<i>Sulf2</i>	0,88	1,84	0,00074
<i>Fbln5</i>	0,87	1,83	0,00008
<i>Adssl1</i>	0,86	1,82	0,00166
<i>Mxra8</i>	0,86	1,82	0,00692
<i>Agap1</i>	0,84	1,79	0,00072
<i>Hal</i>	0,83	1,78	0,00012
<i>Fxyd6</i>	0,82	1,77	0,00487
<i>Olr1</i>	0,81	1,75	0,00372
<i>St8sia6</i>	0,80	1,74	0,00152
<i>Mrc2</i>	0,80	1,74	0,00244
<i>Gm25911</i>	0,78	1,72	0,00011
<i>Cacnb4</i>	0,77	1,71	0,00847
<i>Gm14584</i>	0,77	1,70	0,00244
<i>Wdr35</i>	0,76	1,70	0,00021
<i>Plxnc1</i>	0,75	1,68	0,00142
<i>Galc</i>	0,74	1,67	0,00012
<i>Gm25732</i>	0,73	1,66	0,00037
<i>Clec7a</i>	0,72	1,65	0,00543
<i>Tmem176a</i>	0,72	1,65	0,00009
<i>Vegfa</i>	0,71	1,64	0,00177
<i>Fyn</i>	0,71	1,64	0,00400
<i>Efr3b</i>	0,71	1,63	0,00222
<i>Kif1a</i>	0,71	1,63	0,00392
<i>Atp1a3</i>	0,70	1,63	0,00094
<i>Fndc4</i>	0,70	1,63	0,00104
<i>Rnf128</i>	0,70	1,63	0,00157
<i>Gm19386</i>	0,70	1,62	0,00257
<i>Gpr81</i>	0,69	1,62	0,00223
<i>Gas7</i>	0,68	1,60	0,00274
<i>Itgax</i>	0,67	1,59	0,00163
<i>AI504432</i>	0,66	1,58	0,00949
<i>Ephx1</i>	0,66	1,58	0,00398
<i>Ank</i>	0,65	1,57	0,00074
<i>Asb10</i>	0,65	1,57	0,00009
<i>Tmem176b</i>	0,64	1,56	0,00032
<i>Laptm4a</i>	0,64	1,56	0,00010
<i>Zfp618</i>	0,63	1,55	0,00200



ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Galns</i>	0,63	1,55	0,00043
<i>Arap2</i>	0,63	1,55	0,00195
<i>Fgf13</i>	0,63	1,55	0,00043
<i>Etl4</i>	0,63	1,55	0,00213
<i>Crip1</i>	0,63	1,55	0,00149
<i>Chst11</i>	0,63	1,54	0,00050
<i>Wif1</i>	0,63	1,54	0,00965
<i>Maoa</i>	0,62	1,54	0,00110
<i>Fam214a</i>	0,62	1,53	0,00022
<i>Rasd1</i>	0,61	1,53	0,00074
<i>Procr</i>	0,61	1,52	0,00171
<i>Myo5a</i>	0,61	1,52	0,00609
<i>Emp2</i>	0,60	1,52	0,00383
<i>Ighv1-69</i>	0,60	1,52	0,00863
<i>Gm24245</i>	0,60	1,51	0,00070
<i>Gm24270</i>	0,60	1,51	0,00070
<i>Gm24187</i>	0,60	1,51	0,00054
<i>Gm26993</i>	0,60	1,51	0,00994
<i>Bambi</i>	0,59	1,51	0,00789
<i>Cers4</i>	0,59	1,51	0,00076
<i>Usp30</i>	0,59	1,50	0,00123
<i>Gm8034</i>	0,58	1,50	0,00685
<i>Leprel4</i>	0,58	1,50	0,00105
<i>Naaa</i>	0,58	1,50	0,00227
<i>Pdcd1</i>	0,58	1,49	0,00729
<i>Gm3788</i>	0,58	1,49	0,00162
<i>Slc44a1</i>	0,57	1,49	0,00166
<i>Gm23388</i>	0,57	1,49	0,00047
<i>Nr4a2</i>	0,57	1,48	0,00282
<i>Iqcg</i>	0,57	1,48	0,00196
<i>Lama3</i>	0,57	1,48	0,00510
<i>Ppap2a</i>	0,56	1,48	0,00329
<i>Arrdc4</i>	0,56	1,48	0,00304
<i>Rai14</i>	0,56	1,48	0,00237
<i>Selm</i>	0,55	1,46	0,00429
<i>Tmem203</i>	0,55	1,46	0,00168
<i>Acp5</i>	0,55	1,46	0,00438
<i>Mcam</i>	0,54	1,46	0,00569
<i>Gm25554</i>	0,54	1,46	0,00362
<i>Ipcef1</i>	0,53	1,45	0,00864
<i>F2r</i>	0,53	1,44	0,00078



## ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Dapk1</i>	0,53	1,44	0,00543
<i>Tbc1d4</i>	0,53	1,44	0,00163
<i>Kcnk3</i>	0,52	1,44	0,00053
<i>Arg2</i>	0,52	1,44	0,00642
<i>St14</i>	0,52	1,44	0,00509
<i>Hdac9</i>	0,52	1,44	0,00210
<i>Gramd3</i>	0,52	1,43	0,00078
<i>Crtap</i>	0,52	1,43	0,00856
<i>S100a1</i>	0,52	1,43	0,00930
<i>Gyg</i>	0,52	1,43	0,00613
<i>Maged1</i>	0,51	1,42	0,00090
<i>Mt2</i>	0,51	1,42	0,00216
<i>Cd34</i>	0,50	1,42	0,00971



## Tabla suplementaria 10

**Tabla suplementaria 10. Genes incluidos en el GS "PHD3KO DOWN".** Genes que disminuyen su expresión en microglía CD11b+/CD45+ aislada mediante FACS de ratones de 12 meses de edad *Elgn3* -/-; *APP-PSEN1* versus *APP-PSEN1* (logFC < - 0,5 y  $p < 0,01$ ).

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Gm11883</i>	-0,50	0,71	0,00105
<i>Gm10337</i>	-0,51	0,70	0,00925
<i>Stard9</i>	-0,52	0,70	0,00078
<i>Dst</i>	-0,52	0,70	0,00756
<i>Trim25</i>	-0,52	0,70	0,00927
<i>Gm7278</i>	-0,52	0,70	0,00211
<i>Gm11261</i>	-0,52	0,70	0,00222
<i>G2e3</i>	-0,52	0,70	0,00987
<i>Grap</i>	-0,52	0,70	0,00432
<i>Gm21886</i>	-0,53	0,69	0,00089
<i>Dock4</i>	-0,53	0,69	0,00354
<i>Gm14737</i>	-0,53	0,69	0,00421
<i>Mir3074-1</i>	-0,53	0,69	0,00733
<i>Peg10</i>	-0,54	0,69	0,00122
<i>Gm12812</i>	-0,54	0,69	0,00682
<i>Il12rb2</i>	-0,54	0,69	0,00860
<i>Gm14265</i>	-0,55	0,69	0,00105
<i>Gm11886</i>	-0,55	0,68	0,00037
<i>Gm14888</i>	-0,55	0,68	0,00196
<i>Gm13570</i>	-0,56	0,68	0,00473
<i>Gm12840</i>	-0,56	0,68	0,00735
<i>Cryba4</i>	-0,56	0,68	0,00759
<i>Lilrb3</i>	-0,57	0,68	0,00540
<i>Gm11652</i>	-0,57	0,68	0,00792
<i>Gm26857</i>	-0,57	0,67	0,00084
<i>Gm11995</i>	-0,58	0,67	0,00220
<i>Abl2</i>	-0,58	0,67	0,00048
<i>Gm13710</i>	-0,58	0,67	0,00238
<i>Enpp4</i>	-0,58	0,67	0,00110
<i>Hbb-bs</i>	-0,58	0,67	0,00245
<i>RP23-142E18.5</i>	-0,58	0,67	0,00388
<i>Gm26520</i>	-0,58	0,67	0,00083
<i>Cd40</i>	-0,58	0,67	0,00127
<i>Bco2</i>	-0,58	0,67	0,00621
<i>Stab1</i>	-0,59	0,66	0,00396
<i>Gm13765</i>	-0,59	0,66	0,00488
<i>BC035044</i>	-0,60	0,66	0,00494



## ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Gm10099</i>	-0,60	0,66	0,00162
<i>Trim30a</i>	-0,60	0,66	0,00517
<i>Hivep1</i>	-0,60	0,66	0,00531
<i>Gm23247</i>	-0,61	0,66	0,00741
<i>Pira2</i>	-0,61	0,66	0,00601
<i>Gm10091</i>	-0,61	0,66	0,00730
<i>Gm14749</i>	-0,61	0,65	0,00076
<i>Gm19279</i>	-0,61	0,65	0,00960
<i>Gm23734</i>	-0,61	0,65	0,00525
<i>Pttg1</i>	-0,63	0,65	0,00481
<i>Crybb1</i>	-0,63	0,65	0,00121
<i>Xdh</i>	-0,63	0,65	0,00189
<i>Elmo1</i>	-0,63	0,65	0,00264
<i>Gm13519</i>	-0,64	0,64	0,00014
<i>Swap70</i>	-0,64	0,64	0,00670
<i>Atp6v1d</i>	-0,64	0,64	0,00667
<i>Gm12437</i>	-0,64	0,64	0,00637
<i>Gm24198</i>	-0,64	0,64	0,00793
<i>Olfir755-ps1</i>	-0,64	0,64	0,00342
<i>Gm20689</i>	-0,64	0,64	0,00353
<i>Ap4s1</i>	-0,64	0,64	0,00272
<i>Ccl5</i>	-0,64	0,64	0,00138
<i>Parp14</i>	-0,65	0,64	0,00500
<i>Mir5124</i>	-0,65	0,64	0,00191
<i>Gm4992</i>	-0,65	0,64	0,00091
<i>Pira1</i>	-0,65	0,64	0,00416
<i>Lst1</i>	-0,66	0,63	0,00020
<i>Gm22731</i>	-0,66	0,63	0,00089
<i>Gm14063</i>	-0,66	0,63	0,00081
<i>Tnfsf9</i>	-0,66	0,63	0,00486
<i>mmu-mir-7679</i>	-0,67	0,63	0,00269
<i>Epha2</i>	-0,67	0,63	0,00059
<i>Gm14814</i>	-0,68	0,63	0,00066
<i>Ccl9</i>	-0,69	0,62	0,00623
<i>Trim30b</i>	-0,70	0,62	0,00500
<i>Gbp7</i>	-0,70	0,62	0,00481
<i>Usp18</i>	-0,70	0,62	0,00747
<i>Mir505</i>	-0,70	0,61	0,00683
<i>Gm14941</i>	-0,70	0,61	0,00168
<i>Gm13701</i>	-0,71	0,61	0,00295
<i>Gm14702</i>	-0,71	0,61	0,00272



ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Gm13468</i>	-0,71	0,61	0,00150
<i>Gm14928</i>	-0,72	0,61	0,00041
<i>Gm14672</i>	-0,72	0,61	0,00682
<i>Gm14654</i>	-0,72	0,61	0,00273
<i>Sp100</i>	-0,73	0,60	0,00112
<i>Odc1</i>	-0,73	0,60	0,00066
<i>LOC432823</i>	-0,73	0,60	0,00098
<i>Gm3513</i>	-0,74	0,60	0,00047
<i>Gm16558</i>	-0,74	0,60	0,00619
<i>Gm14969</i>	-0,75	0,60	0,00006
<i>Baiap2</i>	-0,75	0,60	0,00328
<i>Gm14700</i>	-0,75	0,59	0,00554
<i>Slfn8</i>	-0,75	0,59	0,00337
<i>Hba-a1</i>	-0,76	0,59	0,00696
<i>Gm14708</i>	-0,76	0,59	0,00041
<i>Gm15470</i>	-0,77	0,59	0,00056
<i>Gm4955</i>	-0,77	0,59	0,00357
<i>Bank1</i>	-0,78	0,58	0,00235
<i>Gm13574</i>	-0,78	0,58	0,00300
<i>Sorl1</i>	-0,80	0,57	0,00434
<i>Gm14778</i>	-0,80	0,57	0,00150
<i>Gm12197</i>	-0,80	0,57	0,00454
<i>Gm23300</i>	-0,81	0,57	0,00019
<i>Gm9115</i>	-0,81	0,57	0,00033
<i>Gm13840</i>	-0,81	0,57	0,00294
<i>LOC215866</i>	-0,82	0,57	0,00570
<i>Trim5</i>	-0,82	0,57	0,00059
<i>Gm11187</i>	-0,83	0,56	0,00978
<i>Gm15371</i>	-0,84	0,56	0,00617
<i>Gm17709</i>	-0,85	0,56	0,00047
<i>Mir15a</i>	-0,85	0,55	0,00627
<i>Gm15724</i>	-0,87	0,55	0,00719
<i>Gm19313</i>	-0,87	0,55	0,00434
<i>mmu-mir-6972</i>	-0,88	0,54	0,00057
<i>Gm12651</i>	-0,90	0,53	0,00344
<i>Ggta1</i>	-0,91	0,53	0,00016
<i>Hba-a1</i>	-0,92	0,53	0,00501
<i>Mrgpra2a</i>	-0,92	0,53	0,00867
<i>Nlrp1b</i>	-0,92	0,53	0,00150
<i>Gm14693</i>	-0,93	0,53	0,00987
<i>Gm24112</i>	-0,94	0,52	0,00961





## ANEXOS

Nombre del gen	Log FC	Lineal FC	p
<i>Gm24927</i>	-0,94	0,52	0,00387
<i>Trim12a</i>	-0,96	0,52	0,00015
<i>Rsad2</i>	-0,96	0,51	0,00140
<i>Ifi2712a</i>	-0,98	0,51	0,00309
<i>Gm25931</i>	-0,98	0,51	0,00977
<i>Myo1g</i>	-0,99	0,51	0,00223
<i>Gm12424</i>	-0,99	0,50	0,00434
<i>Gm14604</i>	-1,00	0,50	0,00655
<i>Gm25138</i>	-1,00	0,50	0,00008
<i>Gm25549</i>	-1,02	0,49	0,00176
<i>Gm11247</i>	-1,03	0,49	0,00370
<i>Al607873</i>	-1,04	0,49	0,00396
<i>Gm11522</i>	-1,04	0,49	0,00053
<i>Oas2</i>	-1,04	0,49	0,00080
<i>Ifi204</i>	-1,08	0,47	0,00323
<i>Gm14060</i>	-1,13	0,46	0,00329
<i>Rnf213</i>	-1,13	0,46	0,00128
<i>Pyhin1</i>	-1,14	0,45	0,00104
<i>Oas1g</i>	-1,16	0,45	0,00122
<i>Oas1a</i>	-1,27	0,41	0,00445
<i>Gm15445</i>	-1,33	0,40	0,00402
<i>Trim30c</i>	-1,36	0,39	0,00023
<i>Mid1</i>	-1,42	0,37	0,00080
<i>Mir34a</i>	-1,50	0,35	0,00314
<i>Gm25720</i>	-1,53	0,35	0,00720
<i>Zfp125</i>	-1,56	0,34	0,00001
<i>Gm21742</i>	-1,65	0,32	0,00022
<i>Nlrp1c-ps</i>	-1,67	0,31	0,00183
<i>Trim30d</i>	-1,72	0,30	0,00832
<i>Gm22748</i>	-2,13	0,23	0,00000
<i>Egln3</i>	-3,48	0,09	0,00000



## 9.2. ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Procesamiento de la APP: vía amiloidogénica y no amiloidogénica.....	4
<b>Figura 2.</b> Factores de riesgo genéticos de la EA y sus funciones fisiológicas generales.....	6
<b>Figura 3.</b> Origen de la microglía.....	8
<b>Figura 4.</b> Regulación de la estabilidad de la subunidad HIF $\alpha$ por O <sub>2</sub> .....	15
<b>Figura 5.</b> La hipoxia sistémica crónica disminuye el agrupamiento de la A $\beta$ AM.....	23
<b>Figura 6.</b> Un área cerebral propensa a la hipoxia muestra disfunción microglial en cerebros de pacientes con EA.....	24
<b>Figura 7.</b> La hipoxia crónica aumenta la distrofia axonal asociada a A $\beta$ .....	25
<b>Figura 8.</b> La ausencia de <i>Egln3</i> en el modelo murino de EA <i>APP-PSEN1</i> aumenta la cercanía de la microglía a las placas y disminuye las distrofias neuronales.....	26
<b>Figura 9.</b> La ausencia de <i>Egln3</i> en el modelo de la EA <i>APP-PSEN1</i> rescata los defectos motores y de memoria a corto plazo asociados a la EA.....	27
<b>Figura 10.</b> Las placas de A $\beta$ están rodeadas de microglía y son áreas hipoperfundidas e hipóxicas.....	36
<b>Figura 11.</b> La expresión del ARNm de <i>Hif1a</i> en microglía se restringe a la zona cercana a depósitos amiloides.....	37
<b>Figura 12.</b> La transcripción de la A $\beta$ AM está mediada por HIF.....	38
<b>Figura 13.</b> La exposición a hipoxia produce cambios transcripcionales en la microglía.....	39
<b>Figura 14.</b> El tratamiento con TMX reduce los niveles de expresión a nivel de ARNm y de proteína de HIF1 $\alpha$ , que regula la actividad transcripcional de los genes inducidos por hipoxia en muestras de cultivos primarios de microglía.....	41
<b>Figura 15.</b> Los GSs “HMS” y “MGnD” están incrementados en la microglía del modelo murino de EA <i>APP-PSEN1</i> .....	42
<b>Figura 16.</b> La acumulación de A $\beta$ induce la expresión mediada por HIF1 de genes de la HMS....	44
<b>Figura 17.</b> Resumen de las diferentes poblaciones microgliales aisladas por FACS.....	45
<b>Figura 18.</b> CLEC7a está incrementado en la microglía de los ratones <i>APP<sub>751</sub>SL</i> y <i>MAPTp.P301S</i> en estado patológico.....	46
<b>Figura 19.</b> La microglía de los ratones modelos <i>APP<sub>751</sub>SL</i> y <i>MAPTp.P301S</i> muestran perfiles de transcripción globales similares que difieren de los de la microglía de ratones WT.....	47
<b>Figura 20.</b> La transcripción de la HMS y la OXPHOS diferencia a la A $\beta$ AM de la DAM.....	48
<b>Figura 21.</b> Expresión de los GSs “MGnD”, “HMS” y “OXPHOS” en la microglía de diferentes modelos murinos de neurodegeneración y envejecimiento.....	55



## ANEXOS

<b>Figura 22.</b> GSEA que muestra que la hipoxia produce incremento de glucólisis y disminución de la OXPHOS en cultivos primarios de microglía.....	56
<b>Figura 23.</b> Ensayos de <i>Seahorse</i> revelan que en cultivos primarios de microglía la glucólisis aumenta y la OXPHOS disminuye por hipoxia.....	59
<b>Figura 24.</b> En la A $\beta$ AM la mitocondria se elonga y el retículo endoplásmico se expande.....	60
<b>Figura 25.</b> La expresión de <i>Pdk1</i> está incrementada en los cultivos de microglía expuestos a condiciones de hipoxia, pero no en la A $\beta$ AM de diferentes modelos de EA.....	61
<b>Figura 26.</b> La eliminación de <i>Vhl</i> en el modelo de EA <i>APP-PSEN1</i> incrementa la expresión de la HMS y reduce la OXPHOS.....	62
<b>Figura 27.</b> La eliminación de <i>Vhl</i> en el modelo de la EA <i>APP-PSEN1</i> induce disfunción microglial.....	63
<b>Figura 28.</b> La expresión del ARNm de <i>Egln3</i> en microglía se restringe a la zona cercana a depósitos amiloides.....	64
<b>Figura 29.</b> La ausencia de <i>Egln3</i> en el modelo murino de la EA <i>APP-PSEN1</i> potencia la respuesta transcripcional en la microglía de genes relacionados con la acumulación de A $\beta$ .....	68
<b>Figura 30.</b> La ausencia de <i>Egln3</i> en el modelo murino de la EA <i>APP-PSEN1</i> disminuye la expresión en la microglía de factores de riesgos genéticos asociados con esta enfermedad.....	69
<b>Figura 31.</b> La ausencia de <i>Egln3</i> en el modelo murino de la EA <i>APP-PSEN1</i> produce cambios metabólicos en la microglía.....	71
<b>Figura 32.</b> La ausencia de <i>Egln3</i> en el modelo murino de la EA <i>APP-PSEN1</i> reprime la respuesta antimicrobiana en la microglía.....	73
<b>Figura 33.</b> La ausencia de <i>Egln3</i> en el modelo murino de la EA <i>APP-PSEN1</i> reprime la IFN- $\beta$ S en la microglía.....	76
<b>Figura 34.</b> La IFN- $\beta$ S está incrementada en la microglía de diferentes modelos murinos de la EA que acumulan A $\beta$ .....	77
<b>Figura 35.</b> El tratamiento con TMX disminuye los niveles de expresión del gen <i>Egln3</i> de forma específica en la microglía.....	78
<b>Figura 36.</b> La proliferación microglial y la expresión de la proteína de superficie CD45 no se ven afectadas por la disminución de la expresión de <i>Egln3</i> de forma específica en las células de microglía.....	79
<b>Figura 37.</b> La disminución de expresión de <i>Egln3</i> de forma específica en la microglía del modelo murino <i>APP-PSEN1</i> reprime la expresión de genes de la IFN- $\beta$ S.....	80
<b>Figura 38.</b> En muestras de corteza del modelo murino <i>APP-PSEN</i> deficiente en <i>Egln3</i> también se observa incremento de la expresión de genes relacionados con la acumulación de A $\beta$ .....	84
<b>Figura 39.</b> La disminución de la expresión de algunos genes observada en la microglía del modelo murino <i>APP-PSEN1</i> deficiente en <i>Egln3</i> también se observa en parcialmente en muestras de corteza.....	85



<b>Figura 40.</b> El tratamiento con ARNi de <i>Foxo3a</i> disminuye la expresión de dicho gen y de la proteína que codifica en muestras de cultivos primarios de microglía de ratón.....	86
<b>Figura 41.</b> FOXO3 actúa como represor de los genes de la IFN- $\beta$ S en la microglía.....	87
<b>Figura 42.</b> La ausencia de hidroxilación y la inhibición del proteasoma provocan la estabilización de HIF1 $\alpha$ en la microglía.....	88
<b>Figura 43.</b> La ausencia de hidroxilación y la inhibición del proteasoma provocan la estabilización de FOXO3 en la microglía.....	89
<b>Figura 44.</b> HIF1 interacciona tanto con PHD1 como con PHD3 en las células HEK-293T en presencia de DMOG.....	90
<b>Figura 45.</b> FOXO3 interacciona con PHD3 pero no con PHD1 en las células HEK-293T en presencia de DMOG.....	91
<b>Figura 46.</b> Al inhibir el proteasoma se observa una fuerte interacción entre FOXO3 y PHD3 en células HEK-293T que no se rompe por tratamiento con SDS.....	91
<b>Figura 47.</b> Estrategia empleada para el aislamiento de células de microglía CD11b+/CD45+ .....	125
<b>Figura 48.</b> Estrategia empleada para el aislamiento de células de microglía CLEA7a+ .....	126



## ANEXOS

### 9.3. ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Los 5 GSs de la categoría “ <i>Biological Processes</i> ” que más incrementan su expresión en la microglía aislada de ratones <i>APP-PSEN1 versus WT</i> .....	43
<b>Tabla 2.</b> Los 10 GSs de la categoría “ <i>Biological Processes</i> ” que más incrementan su expresión en la microglía aislada de ratones <i>APP<sub>751</sub>SL versus WT</i> .....	49
<b>Tabla 3.</b> Los 10 GSs de la categoría “ <i>Biological Processes</i> ” que más incrementan su expresión en la microglía aislada de ratones <i>MAPTp.P301S versus WT</i> .....	50
<b>Tabla 4.</b> Los 3 GSs de la categoría “ <i>Biological Processes</i> ” que más incrementan su expresión en la microglía aislada de ratones <i>APP<sub>751</sub>SL versus MAPTp.P301S</i> .....	50
<b>Tabla 5.</b> Los 10 GSs de la categoría “ <i>Biological Processes</i> ” que más incrementan su expresión en la microglía aislada de ratones <i>5xfAD versus WT</i> .....	51
<b>Tabla 6.</b> Los 10 GSs de la categoría “ <i>Biological Processes</i> ” que más incrementan su expresión en la microglía aislada de ratones <i>SOD1p.G93A versus WT</i> .....	52
<b>Tabla 7.</b> Los 10 GSs de la categoría “ <i>Biological Processes</i> ” que más incrementan su expresión en la microglía aislada de ratones WT envejecidos.....	53
<b>Tabla 8.</b> Los 10 GSs de la categoría “ <i>Biological Processes</i> ” que más disminuyen su expresión en la microglía aislada en ratones WT envejecidos.....	54
<b>Tabla 9.</b> Los 10 GSs de la categoría “ <i>KEGG Pathway</i> ” que más incrementan su expresión en los cultivos primarios de microglía expuestos a condiciones de hipoxia <i>versus</i> normoxia.....	57
<b>Tabla 10.</b> Los 10 GSs de la categoría “ <i>KEGG Pathway</i> ” que más disminuyen su expresión en los cultivos primarios de microglía expuestos a condiciones de hipoxia <i>versus</i> normoxia.....	58
<b>Tabla 11.</b> Los 10 GSs de la categoría “ <i>Biological Processes</i> ” que más incrementan su expresión en la microglía aislada de ratones <i>Elgn3 -/-; APP-PSEN1 versus APP-PSEN1</i> .....	66
<b>Tabla 12.</b> Los 10 GSs de la categoría “ <i>Biological Processes</i> ” que más incrementan su expresión en la microglía aislada de ratones <i>Elgn3 -/-; APP-PSEN1 versus APP-PSEN1</i> .....	67
<b>Tabla 13.</b> Los 10 GSs de la categoría “ <i>KEGG Pathway</i> ” que más incrementan su expresión en la microglía aislada de ratones <i>Elgn3 -/-; APP-PSEN1 versus APP-PSEN1</i> .....	70
<b>Tabla 14.</b> Los 10 GSs de la categoría “ <i>KEGG Pathway</i> ” que más disminuyen su expresión en la microglía aislada de ratones <i>Elgn3 -/-; APP-PSEN1 versus APP-PSEN1</i> .....	72
<b>Tabla 15.</b> Los 15 GSs de la categoría “ <i>Biological Processes</i> ” que más disminuyen su expresión en la microglía aislada de ratones <i>Elgn3 -/-; APP-PSEN1 versus APP-PSEN1</i> .....	75
<b>Tabla 16.</b> Los 5 GSs de la categoría “ <i>KEGG Pathway</i> ” que más incrementan su expresión en la corteza de ratones de 6 meses de edad <i>Elgn3 -/-; APP-PSEN1 versus APP-PSEN1</i> .....	81
<b>Tabla 17.</b> Los 5 GSs de la categoría “ <i>KEGG Pathway</i> ” que más disminuyen su expresión en la corteza de ratones de 6 meses de edad <i>Elgn3 -/-; APP-PSEN1 versus APP-PSEN1</i> .....	82
<b>Tabla 18.</b> Los 5 GSs de la categoría “ <i>KEGG Pathway</i> ” que más incrementan su expresión en la corteza de ratones de 12 meses de edad <i>Elgn3 -/-; APP-PSEN1 versus APP-PSEN1</i> .....	82



<b>Tabla 19.</b> Los 5 GSs de la categoría “KEGG Pathway” que más disminuyen su expresión en la corteza de ratones de 12 meses de edad <i>Elgn3</i> <sup>-/-</sup> ; <i>APP-PSEN1</i> versus <i>APP-PSEN1</i> .....	83
<b>Tabla 20.</b> Condiciones de reacción de PCR para genotipado.....	117
<b>Tabla 21.</b> Oligonucleótidos usados para el genotipado.....	119
<b>Tabla 22.</b> Secuencias de ARNi.....	122
<b>Tabla 23.</b> Plásmidos usados para las transfecciones en las células HEK-293T.....	123
<b>Tabla 24.</b> Oligonucleótidos usados para qPCR.....	129
<b>Tabla 25.</b> Sondas <i>Taqman</i> usadas para qPCR.....	130
<b>Tabla suplementaria 1.</b> Factores de transcripción enriquecidos en la AβAM.....	181
<b>Tabla suplementaria 2.</b> Genes diferencialmente expresados en cultivos primarios de microglía expuestos a condiciones de hipoxia versus normoxia.....	216
<b>Tabla suplementaria 3.</b> Genes incluidos en el GS “HMS” .....	225
<b>Tabla suplementaria 4.</b> Genes incluidos en el GS “MGnD” .....	229
<b>Tabla suplementaria 5.</b> Genes diferencialmente expresados en la microglía de ratones <i>APP</i> <sub>751</sub> <i>SL</i> versus a la de ratones WT.....	230
<b>Tabla suplementaria 6.</b> Genes diferencialmente expresados en la microglía de ratones <i>MAPT</i> <sub>p.P301S</sub> versus a la de ratones WT.....	263
<b>Tabla suplementaria 7.</b> Genes diferencialmente expresados en la microglía de ratones <i>APP</i> <sub>751</sub> <i>SL</i> versus a la de ratones <i>MAPT</i> <sub>p.P301S</sub> .....	294
<b>Tabla suplementaria 8.</b> Genes diferencialmente expresados en la microglía aislada de ratones <i>Elgn3</i> <sup>-/-</sup> ; <i>APP-PSEN1</i> versus <i>APP-PSEN1</i> .....	298
<b>Tabla suplementaria 9.</b> Genes incluidos en el GS “ <i>PHD3KO UP</i> ” .....	309
<b>Tabla suplementaria 10.</b> Genes incluidos en el GS “ <i>PHD3KO DOWN</i> ” .....	313



## ANEXOS

## 9.4. ABREVIATURAS

<b>2-DG</b>	2-deoxiglucosa	<b>DE</b>	Diferencialmente expresados
<b>4E-BP1</b>	Proteína 1 de unión a 4E ( <i>4E-binding protein 1</i> )	<b>DMOG</b>	Dimetiloxalilglicina
<b>Aβ</b>	β-amiloide ( <i>Amyloid-β</i> )	<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>AβAM</b>	Microglía asociada a Aβ ( <i>Aβ associated microglia</i> )	<b>dNTP</b>	Desoxirribonucleótido trifosfato
<b>ACC2</b>	Acetil-coenzima A carboxilasa 2	<b>EA</b>	Enfermedad de Alzheimer
<b>AD</b>	<i>Alzheimer's disease</i>	<b>ECAR</b>	Tasa de acidificación extracelular ( <i>Extracellular acidification rate</i> )
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico	<b>EGLN</b>	<i>EGL-9 family hypoxia inducible factor</i>
<b>ADNc</b>	ADN complementario	<b>eIF4E</b>	Factor de iniciación de la traducción eucariota 4 ( <i>Eukaryotic translation initiation factor 4E</i> )
<b>APH-1</b>	<i>Anterior pharynx-defective 1</i>	<b>ELA</b>	Esclerosis lateral amiotrófica
<b>APOE</b>	Apolipoproteína E	<b>EPOC</b>	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
<b>APP</b>	Proteína precursora amiloide ( <i>Amyloid precursor protein</i> )	<b>ERK</b>	Quinasa regulada por señalización extracelular ( <i>Extracellular-signal regulated kinase</i> )
<b>ARNi</b>	Ácido ribonucleico interferente	<b>EV</b>	Vector vacío ( <i>Empty vector</i> )
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero	<b>FACS</b>	Clasificación de células activadas por fluorescencia ( <i>Fluorescence activated cell sorting</i> )
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina ( <i>Adenosine triphosphate</i> )	<b>FBS</b>	Suero fetal bovino ( <i>Fetal bovine serum</i> )
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino ( <i>Bovine serum albumin</i> )	<b>FCCP</b>	Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona
<b>CCL2</b>	Quimioquina motivo C-C ligando 2 ( <i>Chemokine C-C motif ligand 2</i> )	<b>FIH</b>	Factor inhibidor de HIF
<b>ChIP-seq</b>	Secuenciación de cromatina inmunoprecipitada ( <i>Chromatine immunoprecipitation sequencing</i> )	<b>FSC</b>	Dispersión frontal ( <i>Forward scatter</i> )
<b>CNS</b>	<i>Central nervous system</i>		
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono		
<b>CPT1</b>	Carnitina palmitoiltransferasa 1		
<b>DAM</b>	Microglía asociada a enfermedad ( <i>Disease associated microglia</i> )		



ANEXOS

<b>FSC-A</b>	Área de dispersión frontal ( <i>Forward scatter area</i> )	<b>M1</b>	Clásica
<b>FSC-H</b>	Altura de dispersión frontal ( <i>Forward scatter height</i> )	<b>M2</b>	Alternativa
<b>GEO</b>	<i>Gene expression omnibus</i>	<b>MAPK</b>	Proteína quinasa activada por mitógenos ( <i>Mitogen-activated protein kinase</i> )
<b>GLUT</b>	Transportador de glucosa ( <i>Glucose transporter</i> )	<b>MAPT</b>	Proteína TAU asociada a microtúbulos ( <i>Microtubule associated protein TAU</i> )
<b>GS</b>	Conjunto de genes ( <i>Gene set</i> )	<b>MGnD</b>	Fenotipo neurodegenerativo microglial ( <i>Microglial neurodegenerative phenotype</i> )
<b>GSEA</b>	Análisis de enriquecimiento de conjunto de genes ( <i>Gene set enrichment analysis</i> )	<b>MHC</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad ( <i>Major histocompatibility complex</i> )
<b>GWAS</b>	Estudios de asociación del genoma completo ( <i>Genome wide association studies</i> )	<b>mTOR</b>	Diana de rapamicina en células de mamífero ( <i>Mammalian target of rapamycin</i> )
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Agua	<b>mTORC1</b>	mTOR complejo 1
<b>HEK</b>	Riñón embrionario humano ( <i>Human embryonic kidney</i> )	<b>mTORC2</b>	mTOR complejo 2
<b>HIF</b>	Factor inducible por hipoxia ( <i>Hypoxia inducible factor</i> )	<b>NAD<sup>+</sup></b>	Nicotinamida adenina dinucleótido
<b>HMS</b>	Firma hipóxica de la microglía ( <i>Hypoxia microglia signature</i> )	<b>NCBI</b>	Centro Nacional para la Información Biotecnológica ( <i>National Center for Biotechnology Information</i> )
<b>HRE</b>	Elemento de respuesta a hipoxia ( <i>Hypoxia response element</i> )	<b>NCT</b>	Nicestrina
<b>IBA1</b>	Molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1 ( <i>Ionized calcium binding adaptor molecule 1</i> )	<b>NEP</b>	Neprilisina
<b>IFN</b>	Interferón	<b>NF-κB</b>	Factor nuclear κB ( <i>Nuclear factor κB</i> )
<b>IFN-βS</b>	Firma de respuesta a IFN-β ( <i>Interferon β signature</i> )	<b>NFTs</b>	Ovillos neurofibrilares ( <i>Neurofibrillary tangles</i> )
<b>IL</b>	Interleuquina	<b>NK</b>	<i>Natural killer</i>
<b>ISH</b>	Hibridación <i>in situ</i> ( <i>In situ hybridization</i> )	<b>O<sub>2</sub></b>	Oxígeno
<b>log FC</b>	Logaritmo de <i>fold change</i>	<b>OCR</b>	Tasa de consumo de oxígeno ( <i>Oxygen consumption rate</i> )
<b>LPS</b>	Lipopolisacáridos		





## ANEXOS

<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud	<b>RNA-seq</b>	Secuenciación de ARN ( <i>RNA sequencing</i> )
<b>OXPHOS</b>	Fosforilación oxidativa ( <i>Oxidative phosphorylation</i> )	<b>RNS</b>	Especies reactivas de nitrógeno ( <i>Reactive nitrogen species</i> )
<b>p</b>	p-valor	<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno ( <i>Reactive oxygen species</i> )
<b>PB</b>	Tampón fosfato ( <i>Phosphate buffer</i> )	<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino ( <i>Phosphate buffered saline</i> )	<b>S6K1</b>	Proteína ribosomal quinasa 1 ( <i>Ribosomal protein S6 kinase 1</i> )
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase chain reaction</i> )	<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sodio ( <i>Sodium dodecyl sulfate</i> )
<b>PDH</b>	Piruvato deshidrogenasa	<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio ( <i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
<b>PDK1</b>	Piruvato deshidrogenasa quinasa 1	<b>SIRT1</b>	Sirtuina 1
<b>PEN2</b>	Potenciador de la PSEN2	<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>PER</b>	Tasa de flujo de protones ( <i>Proton efflux rate</i> )	<b>SSC</b>	Dispersión lateral ( <i>Side scatter</i> )
<b>PHD</b>	Prolil hidroxilasa	<b>STAT3</b>	Transductor de señal y activador de la transcripción 3 ( <i>Signal transducer and activator of transcription 3</i> )
<b>PPAR</b>	Receptores activados por proliferadores de peroxisoma ( <i>Peroxisome proliferator activated receptor</i> )	<b>TBS</b>	Tampón tris salino ( <i>Tris buffered saline</i> )
<b>Prnp</b>	Proteína priónica	<b>TFEA</b>	Análisis de enriquecimiento de factor de transcripción ( <i>Transcription factor enrichment analysis</i> )
<b>PSEN</b>	Presenilina	<b>TGFβ</b>	Factor de crecimiento transformante β ( <i>Transforming growth factor β</i> )
<b>PVDF</b>	Fluoruro de polivinilideno ( <i>Polyvinylidene fluoride</i> )	<b>Tio-S</b>	Tioflavina S
<b>qPCR</b>	PCR cuantitativa ( <i>Quantitative PCR</i> )	<b>TLR</b>	Receptor tipo toll ( <i>Toll like receptor</i> )
<b>qRT-PCR</b>	<i>Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction</i>	<b>TMX</b>	Tamoxifeno
<b>RIN</b>	Número de integridad de ARN ( <i>RNA integrity number</i> )		
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleotid acid</i>		



ANEXOS

<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral $\alpha$ ( <i>Tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i> )
<b>VHL</b>	<i>Von Hippel Lindau</i>
<b>WB</b>	<i>Western blot</i>
<b>WT</b>	Silvestre ( <i>Wild type</i> )

